



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Mestrado em Análises Químicas Ambientais**

**Dissertação**

**Análise Quimiométrica Aplicada à Determinação Voltamétrica de  
Compostos de Tributilestanho em Amostras Biológicas e Não Biológicas**

Dário Filipe Veiga Zabumba

**Orientador:**

Professor Doutor Henrique Vicente

**Co-Orientador:**

Professor Doutor Jorge Teixeira

Évora, 30 de Outubro de 2011



**Mestrado em Análises Químicas Ambientais**

**Dissertação**

**Análise Quimiométrica Aplicada à Determinação Voltamétrica de  
Compostos de Tributilestanho em Amostras Biológicas e Não Biológicas**

Dário Filipe Veiga Zabumba

**Orientador:**

Professor Doutor Henrique Vicente

**Co-Orientador:**

Professor Doutor Jorge Teixeira



*A todos aqueles que neste processo endotérmico  
contribuíram com a sua energia o meu muito  
obrigado pois tornaram possível escrever o  
último ponto final.*



## Agradecimentos

Longe vai o dia em que decidi iniciar este projecto...

E após esse dia muitos foram já os lugares por onde passei, alguns nos quais vivi, fruto sobretudo deste fado que persegue os professores de hoje. Em todos eles encontrei inspiração para a concretização deste trabalho. A caminhada iniciou-se em Ourique onde encontrei pessoas extraordinárias das quais destaco, sem sombra da dúvida, duas muito importantes: Ilídio Cadime e António Campião. Aos dois o meu maior obrigado por toda a amizade que partilhamos. Passou depois pela margem Sul, Seixal e Sesimbra, onde me encontro hoje enquanto escrevo estas palavras, no sossego do meu lar.

Durante este percurso muitas foram as pessoas que se cruzaram com ele e a muitas gostaria de agradecer. Porém, e porque certamente me iria esquecer de algumas, vou apenas destacar aquelas que desde sempre estiveram envolvidas neste projecto.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais por sempre me terem apoiado e que desde o primeiro dia me suportam, a todos os níveis. A vós o obrigado que provavelmente nunca disse...

Quero também agradecer àquela pessoa que tantas vezes me perguntou “*estás a mextar?*” e me deu sempre força para que este dia chegasse. *Ana*, muito obrigado.

Por fim quero destacar mais duas pessoas que foram efectivamente muito importantes, diria mesmo preponderantes neste processo. Mostraram-se sempre disponíveis, incansáveis e acompanharam-me desde o início sem nunca desistir, partilhando comigo os seus sábios conselhos e conhecimentos. São eles os meus orientadores a quem prefiro chamar de amigos pois foi exactamente isso que eles foram para mim durante todo este processo. Professor Henrique Vicente e Professor Jorge Teixeira, aos dois, um agradecimento muito especial e a certeza de que a amizade não terminará no final deste processo.

A todos os outros que interferiram neste percurso, muitos de forma positiva, alguns de forma negativa, a todos eles o meu muito obrigado.





## **ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA APLICADA À DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE COMPOSTOS DE TRIBUTILESTANHO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS E NÃO BIOLÓGICAS**

### **Resumo**

O tributilestanho é uma espécie química que tem demonstrado ser altamente tóxica para organismos vivos. É utilizado em tintas anti-incrustantes, aplicadas sobretudo no revestimento de cascos de embarcações e outras estruturas marinhas com o objectivo de evitar a deposição de organismos vivos.

O tributilestanho, tal como os seus derivados, apresenta um comportamento muito complexo, nomeadamente no que respeita à determinação e quantificação através de métodos electroquímicos.

Este trabalho apresenta uma nova abordagem, aliando a voltametria de onda quadrada de redissolução anódica a redes neuronais artificiais. Esta técnica, oriunda da Área Científica da Inteligência Artificial, permite analisar os dados obtidos por voltametria de onda quadrada de redissolução anódica e encontrar um padrão comportamental que permite quantificar o tributilestanho em amostras de água salgada recolhidas no porto de Sesimbra. É uma técnica muito rápida de executar, de baixo custo e que apresenta taxas de recuperação consideravelmente elevadas.

**Palavras-chave:** Tributilestanho, voltametria de onda quadrada de redissolução anódica, eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, descoberta de conhecimento em bases de dados, redes neuronais artificiais, amostras biológicas, amostras não-biológicas.



## CHEMOMETRIC ANALYSIS APPLIED TO THE VOLTAMETRIC DETERMINATION OF TRIBUTYLTIN COMPOUNDS IN BIOLOGIC AND NON-BIOLOGICAL SAMPLES

### Abstract

Tributyltin is a chemical species that has proven to be highly toxic to living organisms. It is used in antifouling paints, especially in boat hulls coating and other marine structures in order to prevent the deposition of living organisms.

TBT and its derivatives have a very complex behavior, particularly when it comes to the determination and quantification using electrochemical methods.

This project presents a new approach, combining the square wave anodic stripping voltammetry with artificial neural networks. This technique, emanating from the Scientific Area of Artificial Intelligence, enables the analysis of the data obtained by square wave anodic stripping voltammetry and helps in finding a pattern that allows the quantification of Tributyltin in the seawater samples collected at the Sesimbra harbor. This is a very fast and low cost technique which presents considerably high recovery rates.

**Keywords:** Tributyltin, square wave anodic stripping voltammetry, knowledge database discovery, hanging mercury drop electrode, artificial neural networks, biological samples, non-biological samples,



## Índice Geral

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
Índice Geral .....	xi
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Figuras .....	xvii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xxi

### **Introdução ..... 1**

Motivação .....	2
Inteligência Artificial .....	5
Objectivos.....	7
Inovação e Valor Acrescentado .....	7
Organização da Dissertação.....	9

### Capítulo I

### **Química do Tributilestanho ..... 11**

I.1. Propriedades Físicas e Químicas do TBT .....	11
I.2. Métodos analíticos.....	12
I.3. Fontes de Poluição Ambiental .....	13
I.4. Restrições de Utilização .....	14
I.5. Concentração no Ambiente .....	15
I.5.1. Água salgada e sedimentos marinhos.....	15
I.5.2. Água doce e sedimentos.....	16
I.5.3. Águas Residuais .....	17
I.5.4. Biota.....	17
I.6. Transporte e Transformação no Ambiente .....	18
I.7. Cinética e Metabolismo .....	18
I.8. Efeitos em Microorganismos .....	19
I.9. Efeitos em Organismos Aquáticos.....	20
I.9.1. Plantas aquáticas.....	20
I.9.2. Invertebrados aquáticos .....	20
I.9.3. Moluscos .....	21
I.9.4. Peixes .....	21
I.10. Efeitos em Organismos Terrestres .....	22
I.11. Toxicidade em Mamíferos de Laboratório.....	22
I.12. Efeitos nos Humanos .....	23
I.12.1. Avaliação dos riscos para a saúde humana .....	24

## Capítulo II

<b>Métodos Electroquímicos .....</b>	<b>25</b>
II.1. Voltametria .....	26
II.1.1. Voltametria cíclica .....	30
II.1.2. Voltametria de varrimento linear .....	33
II.1.3. Voltametria de impulso diferencial .....	33
II.1.4. Voltametria de onda quadrada .....	34
II.1.5. Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada .....	37
II.1.6. Célula voltamétrica .....	38
II.1.7. Eléctrodos de trabalho.....	40
II.1.8. Remoção do Oxigénio.....	41

## Capítulo III

<b>Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados .....</b>	<b>43</b>
III.1. O processo de Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados .....	44
III.2. <i>Data Mining</i> .....	46
III.3. Modelos e Técnicas de <i>Data Mining</i> .....	48
III.3.1. Árvores de Decisão .....	49
III.3.2. Indução de Regras.....	50
III.3.3. Algoritmos Genéticos .....	50
III.3.4. Aproximação de Vizinhanças .....	51
III.3.5. Redes Neurais Artificiais.....	51
III.3.5.1. Neurónio Artificial ou Nodo .....	53
III.3.5.2. Arquitecturas de rede .....	55
III.3.5.3. Algoritmo de Retro-propagação.....	58
III.4. Avaliação de Modelos.....	59

## Capítulo IV

<b>Parte Experimental .....</b>	<b>63</b>
IV.1. Material e Equipamento Electroquímico .....	63
IV.1.1. Célula electroquímica .....	64
IV.1.2. Eléctrodo de trabalho .....	64
IV.1.3. Eléctrodo de referência.....	65
IV.1.4. Eléctrodo auxiliar.....	65
IV.1.5. Equipamento auxiliar .....	66
IV.1.6. Software .....	66
IV.2. Material e Reagentes .....	66
IV.3. Preparação de Soluções .....	67
IV.4. Medições Voltamétricas.....	68
IV.5. <i>Software WEKA</i> .....	69

## Capítulo V

**Apresentação, Interpretação e Análise de Resultados e Modelos..... 71**

V.1. Estudo do Comportamento Voltamétrico do TBT com Voltametria Cíclica e Eléctrodo de Mercúrio de Gota Suspensa.....	73
V.1.1. Comportamento voltamétrico do TBT na solução electrolítica de base.	73
V.1.2. Estudo do pH .....	75
V.1.3. Estudo do electrólito de suporte .....	79
V.1.4. Estudo da velocidade de varrimento.....	80
V.2. Estudo do Comportamento Voltamétrico do TBT com SWASV e HMDE.....	81
V.2.1. Estudo do potencial .....	81
V.2.2. Estudo do tempo de equilíbrio .....	82
V.2.3. Estudo da frequência .....	83
V.2.4. Estudo da amplitude .....	85
V.3. Métodos Clássicos de Quantificação .....	86
V.3.1. Curva de calibração.....	86
V.4. Aquisição de Dados .....	89
V.5. Preparação dos Dados para o Processo de DCBD .....	92
V.6. Modelação.....	94
V.7. Análise de Sensibilidade dos Modelos.....	102

## Capítulo VI

**Conclusões Finais e Perspectivas Futuras ..... 105**

Referências Bibliográficas.....	109
---------------------------------	-----

Anexo I – Estudo do electrólito de suporte (HCl).....	I
---	---

Anexo II – Estudo do Potencial .....	IV
--------------------------------------	----

Anexo III – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s .....	XII
--	-----





## Índice de Tabelas

Tabela II. 1 - Forma de aplicação do potencial para cada tipo de voltametria.....	30
Tabela III. 1 - Aplicação dos modelos de <i>Data Mining</i> a diversas tarefas.....	49
Tabela III. 2 - Algumas funções de activação .....	55
Tabela IV. 1 - Reagentes utilizados fazendo referência ao grau de pureza e fabricante .....	67
Tabela IV.2 - Condições experimentais utilizadas na voltametria cíclica .....	69
Tabela IV.3 - Condições experimentais utilizadas na voltametria de onda quadrada de redissolução anódica .....	69
Tabela V.1. - Volumes de alíquotas de HCL/NaOH adicionados para o estudo do efeito do pH. ....	75
Tabela V.2. - Parâmetros voltamétricos aplicados nos varrimentos. ....	89
Tabela V.2. - Caracterização estatística das variáveis presentes na base de dados utilizada para as amostras de TBT em água Milli-Q.....	93
Tabela V.3. - Caracterização estatística das variáveis presentes na base de dados utilizada para as amostras de TBT em água salgada. ....	93
Tabela V.4. - Valores de DAM, MQE e <i>bias</i> para as topologias de rede testadas em amostras de água Milli-Q. ....	95
Tabela V.5. - Valores de DAM, MQE e <i>bias</i> para as topologias de rede testadas em amostras de água do porto de Sesimbra. ....	96
Tabela V.6. - Resumo dos valores de concentração previstos para um conjunto de dados de teste, utilizando a RNA seleccionada para amostras de água salgada. ....	101



## Índice de Figuras

Figura II. 1 – Voltamograma típico para um processo reversível. ....	31
Figura II. 2 – Voltamograma típico para um processo irreversível. ....	32
Figura II. 3 – Perfil de aplicação de potenciais em voltametria de impulso diferencial .....	34
Figura II. 4 – Sinal de excitação para a SWV. ....	35
Figura II. 5 – Representação esquemática das intensidades de corrente directa e inversa e a intensidade diferencial.....	36
Figura II. 6 – Célula polarográfica/voltamétrica de três eléctrodos. ....	39
Figura III.1 – O processo de Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados .....	44
Figura III.2 – Fases de desenvolvimento do processo de descoberta de conhecimento em bases de dados agrupadas em tarefas.....	46
Figura III.3 – Estrutura do neurónio artificial de McCulloch e Pitts.....	54
Figura III.4 – Rede Neuronal Unidireccional.....	56
Figura III.5 – Rede Neuronal Recorrente .....	56
Figura IV. 1 – Potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT 20 .....	63
Figura IV. 2 – Posto electroquímico da Metrohm, modelo 663 VA Stand .....	63
Figura IV. 3 – Interface electrónica IME 663 .....	63
Figura IV. 4 – Vareta de agitação.....	64
Figura IV. 5 – Célula electroquímica .....	64
Figura IV. 6 – Eléctrodo Multi-mode .....	64
Figura IV.7 – Eléctrodo de referência Ag/AgCl.....	65
Figura IV.8 – Recipiente que funciona como ponte salina, preparado para adaptar o eléctrodo de referência. ....	65
Figura IV. 9 – Vareta de carbono vítreo .....	65

Figura V.1 – Voltamograma cíclico de 20 mL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ , sem TBT.....	74
Figura V.2 – Voltamograma cíclico de uma mistura de 20 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ ), dopado com 100 $\mu\text{L}$ de TBT ( $3540 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ). .....	74
Figura V.3 – Voltamogramas cíclicos de 20 mL de tampão fosfato $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ , sem TBT. ....	76
Figura V.4 – Voltamogramas cíclicos de uma mistura de 20 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ ), dopado com 100 $\mu\text{L}$ de TBT ( $3540 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ). ....	77
Figura V.5 - Voltamogramas cíclicos de uma mistura de 20 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ ), dopado com 100 $\mu\text{L}$ de TBT ( $3540 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ). ....	77
Figura V.6 – Gráficos de valor de intensidade de corrente registada para os picos anódico e catódico em função da posição (valor de potencial).....	78
Figura V.7 – Voltamogramas cíclicos com diferentes electrólitos de suporte.....	79
Figura V.8 – Voltamogramas cíclicos fazendo variar a velocidade de varrimento, em pH ácido.....	80
Figura V.9 – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento. ....	82
Figura V.10 – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s. ....	82
Figura V.11 – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 5 s. ....	83
Figura V.12 – Voltamogramas fazendo um varrimento de potencial entre -0,6V e -1,2 V.....	84
Figura V.13 – Voltamogramas fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1 V.....	85
Figura V.14 – Voltamogramas de variação da amplitude. ....	85
Figura V.15 – Curva de calibração (posição do pico em função da concentração de TBT).....	86
Figura V.16 – Curva de calibração (altura em função da concentração de TBT). ....	87
Figura V.17 – Curva de calibração (área em função da concentração de TBT). ....	87
Figura V.18 – Curva de calibração (largura a meia altura em função da concentração de TBT).....	88
Figura V.19 – Curva de calibração (derivada em função da concentração de TBT). ....	88

Figura V.20 – Voltamogramas recolhidos directamente sobre uma amostra de água recolhida no porto de Sesimbra (salgada). .....	90
Figura V.21 – Voltamogramas recolhidos utilizando electrólito de suporte e água do mar sem adição de TBT. ....	91
Figura V.22 – Exemplo de voltamograma obtido para uma amostra de TBT em água Milli-Q, de concentração $2,647 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ . ....	91
Figura V.23 – Exemplo de voltamograma obtido para uma amostra de TBT em água salgada, de concentração $1,325 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$ . ....	91
Figura V.24 – RNA seleccionada para a previsão da concentração de TBT em água Milli-Q. ....	96
Figura V.25 – RNA seleccionada para a previsão da concentração de TBT em água salgada. ....	97
Figura V.26 – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água Milli-Q para o conjunto de treino. ....	98
Figura V.27 – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água Milli-Q para o conjunto de teste. ....	98
Figura V.28 – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água do porto de Sesimbra para o conjunto de treino. ....	99
Figura V.29 – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água do porto de Sesimbra para o conjunto de teste. ....	99
Figura V.30 – Representação gráfica dos resíduos em função dos valores previstos para a concentração de TBT em água Milli-Q para os conjuntos de treino e de teste. ....	100
Figura V.31 – Representação gráfica dos resíduos em função dos valores previstos para a concentração de TBT em água salgada para os conjuntos de treino e de teste. ....	100
Figura V.32 – A importância relativa das variáveis de entrada para os modelos de previsão da concentração de TBT. ....	103



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

*Algumas das abreviaturas apresentadas correspondem ao nome em inglês.*

**A** – Amplitude

**AAS** – Espectrometria de absorção atômica

**AG** – Algoritmos genéticos

**BD** – Base de dados

**CFC's** – Clorofluorcarbonetos

**CV** – Voltametria cíclica

**DAM** – Desvio absoluto médio

**DAMR** – Desvio absoluto médio relativo

**DBT** – Dibutilestano

**DCBD** – Descoberta de conhecimento em bases de dados

**DPV** – Voltametria de impulso diferencial

**ECS** – Eléctrodo de calomelanos saturado

**E<sub>i</sub>** – Potencial inicial

**E<sub>f</sub>** – Potencial final

**E<sub>inv</sub>** – Potencial de inversão

**E<sub>pa</sub>** – Potencial de pico anódico

**E<sub>pc</sub>** – Potencial de pico catódico

**ETAR** – Estação de tratamento de águas residuais

**f** – Frequência

**FPD** – Fotometria de chama

**GC** – Cromatografia gasosa

**GC-MID-AED** – Cromatografia gasosa com detector de emissão atômica por plasma induzido por microondas

**GPES** – *General Purpose Electrochemical System*

**HMDE** – Eléctrodo de mercúrio de gota suspensa

**HPLC** – Cromatografia líquida de elevada eficiência

**IA** – Inteligência Artificial

**I<sub>a</sub>** – Intensidade de corrente do pico anódico

**I<sub>c</sub>** – Intensidade de corrente do pico catódico

**ICP-AES** – Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado

**ICP-MS** – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

**LD<sub>50</sub>** – Dose letal

- LSV** – Voltametria de varrimento linear
- MBT** - Monobutilestanho
- MQE** – Média do quadrado dos erros
- MQER** – Média do quadrado dos erros relativa
- P<sub>1pa</sub>** – Posição do primeiro pico anódico
- P<sub>1pc</sub>** – Posição do primeiro pico catódico
- PVC** – Cloreto de polivinilo
- R<sup>2</sup>** – Coeficiente de determinação
- RMQE** – Raiz quadrada da média do quadrado dos erros
- RMQER** – Raiz quadrada da média do quadrado dos erros relativa
- RNA** – Rede neuronal artificial
- RNR** – Rede neuronal recorrente
- RNU** – Rede neuronal unidireccional
- ROC** – Características operacionais de recepção
- SGBD** – Sistemas gestores de bases de dados
- SPME** – Micro-extracção em fase sólida
- SQE** – Soma do quadrado dos erros
- SQER** – Soma do quadrado dos erros relativa
- SWASV** – Voltametria de onda quadrada de redissolução anódica
- SWV** - Voltametria de onda quadrada
- TBT** – Tributilestanho
- TBTO** – Óxido de tributilestanho
- t<sub>eq</sub>** – Tempo de equilíbrio
- v** – Velocidade de varrimento



"We do not inherit the earth from our ancestors;  
we borrow it from our children."

Professor W. A. Turmeau  
Chairman, Scottish Environment Protection Agency

## Introdução

A Terra, este *mundo* que habitamos, é relativamente recente quando comparado com a idade do Universo. O nosso planeta formou-se há muitos milhões de anos. No entanto a vida apareceu, estima-se, há apenas 3.400 milhões de anos com o aparecimento dos primeiros seres unicelulares. Se olharmos então para a existência do Ser Humano sobre este planeta, segundo teorias mais ou menos aceites pela comunidade científica que apontam o *Homo Habilis* como o homínídeo mais antigo, ela remonta há apenas três milhões de anos. Reduzindo esses três milhões de anos a uma escala de um dia, portanto vinte e quatro horas, para termos uma ideia da magnitude da nossa existência, encontramos evidências do aparecimento do primeiro *Homo sapiens* quando faltava mais ou menos uma hora e meia para o fim do dia; as grandes civilizações antigas da Humanidade, como a grega e a egípcia, emergiram quando faltavam apenas três minutos para a meia-noite; Jesus Cristo nasceu quando faltava apenas um minuto para a meia-noite e os últimos cem anos ocupam apenas os três segundos finais desse mesmo dia . Um instante! A maior parte de nós não vive tanto tempo... [Best, 1999; Bryson, 2003]

*Três segundos...* Reduzindo a existência humana na Terra à duração de *um dia*, três segundos foram suficientes para causar danos inigualáveis no nosso ambiente. Os homínídeos que habitaram o planeta Terra nas restantes 23 horas, 59 minutos e 57 segundos *desse dia*, em conjunto, não conseguiram causar tantos danos ambientais como aqueles que habitaram o planeta nos últimos três segundos... *Aqueles...* Parece tão distante de nós mas *aqueles* somos exactamente nós próprios. Todos nós que habitamos o planeta azul e que, dia-a-dia, lhe estamos a infligir danos que, um dia, serão irreversíveis e o levarão para a sepultura.

Durante a maior parte do tempo em que habitámos a Terra mantivemo-la razoavelmente limpa, sem causar danos ao ambiente. De facto, em meados do

século XIX existia relativamente pouca poluição. Hoje em dia somos tantos e queremos tanto os nossos automóveis, os nossos autocarros e aviões, os nossos confortáveis e convenientes modos de vida, que a Terra – *o Nosso Mundo* – está a ficar cada vez mais suja e poluída, cada vez menos habitável. Estamos diariamente a destruir o nosso próprio lar.

Já é tempo de fazer algo em relação a este assunto. Já é tempo de tomarmos consciência de que o nosso planeta não sobreviverá muito mais tempo sujeito a estas agressões diárias. Já é tempo de nos consciencializarmos de que este é o espaço que habitamos, que possui condições únicas e inigualáveis para a nossa existência e sobrevivência, que estão a ser aniquiladas às nossas mãos, através de acções e iniciativas que todos nós, diariamente, exercemos...

## Motivação

A ambição constante do Ser Humano pelo desenvolvimento, pela descoberta, pela melhoria das condições de vida tem, ao longo da evolução humana, dado origem a uma constante degradação dos recursos naturais do nosso planeta, seja pela sua utilização enquanto matéria-prima, seja por interferência directa ou indirecta da aplicação de novos materiais, de forma quase sempre involuntária. Veja-se o exemplo dos clorofluorcarbonetos (CFC's): inicialmente pensava-se serem a solução ideal para sistemas de refrigeração ou como propulsores de *sprays*, uma vez que são quimicamente muito estáveis, não são venenosos, inflamáveis, oxidantes, não causam queimaduras ou irritação e não atraem insectos. No final da década de 60 eram libertados em média um milhão de toneladas de CFC's por ano. Aquela que se pensava na altura ser a solução, em termos químicos, para variadas aplicações do nosso dia-a-dia, veio a transformar-se num dos maiores problemas do século XX em termos ambientais. Como é sabido os CFC's têm a capacidade de reagir com o ozono da estratosfera, degradando-o e originando um *buraco* através do qual passam as radiações UV sem serem filtradas, interferindo com o equilíbrio existente no planeta.

Muitas outras aplicações químicas foram sendo assinaladas ao longo dos tempos como nocivas para o ambiente.



Os compostos de tributilestanho (TBT<sup>1</sup>) são um outro exemplo de compostos químicos utilizados pelo Homem. Estes compostos foram inicialmente usados como estabilizadores que inibem a degradação do Cloreto de Polivinilo (PVC) pelo efeito da luz e/ou calor. Posteriormente foram utilizados, em larga escala, em tintas anti-vegetativas e anti-incrustantes, essencialmente em cascos de embarcações, redes e jaulas de aquacultura e outros instrumentos marinhos, com o intuito de impedir a fixação de organismos como algas e invertebrados. Foi também em tempos utilizado na agricultura como pesticida, conservante de madeiras e, numa escala mais pequena, em desinfectantes e tratamentos algicidas, em materiais de construção [Dobson & Cabridenc, 1990; Kim *et al.*, 2011]. Naturalmente que, devido a efeitos de degradação, estes compostos se vão libertando, sendo disseminados no meio ambiente onde continuam, indesejavelmente, a “mostrar” as suas características.

Níveis relativamente elevados de compostos de TBT têm sido detectados em águas, sedimentos e também em vários seres vivos, quer animais quer vegetais, que se encontram na proximidade de zonas destinadas a embarcações de recreio, especialmente junto de marinas e docas. Segundo alguns autores, o nível das marés e a turbidez influencia a concentração de TBT nas águas [Dobson & Cabridenc, 1990; Kim *et al.*, 2011].

De facto, os compostos de TBT estão identificados como potenciais poluentes, que têm efeitos nocivos no ambiente e no Ser Humano. O Programa Internacional de Segurança Química [Dobson & Cabridenc, 1990] tece algumas recomendações para protecção humana e ambiental, nomeadamente que os países membro que ainda não regulamentaram a utilização de compostos de TBT devem ser encorajados a fazê-lo, que existe uma necessidade emergente de avaliação e, se necessário, de regulação das entradas de compostos de TBT no ambiente através de variadas fontes que não apenas as tintas anti-incrustantes. Por exemplo, a avaliação do risco potencial da aplicação de lamas contaminadas nos solos deve ser implementada e devem ser desenvolvidos métodos melhorados para a aplicação segura e para a remoção e eliminação de tintas contendo compostos organoestânicos. Este programa aponta ainda necessidades de investigação, como o desenvolvimento e melhoria de métodos de detecção e análise que forneçam medições rápidas e exactas de espécies organoestanhosas em concentrações na ordem dos  $\text{pg/dm}^3$ , entre outras.

---

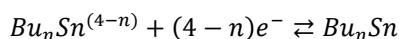
<sup>1</sup> Alguns acrónimos correspondem ao nome em inglês uma vez que possibilitam uma associação mais directa àquilo a que dizem respeito. Na grande maioria dos artigos ou trabalhos em língua portuguesa estes acrónimos são apresentados desta forma.



Devido a todas as recomendações tecidas e aos já conhecidos efeitos tóxicos do TBT, a União Europeia incluiu recentemente esta espécie na lista das que devem ser medidas regularmente em águas doces. É então fundamental que se utilizem, cada vez mais, técnicas que consigam quantificar rigorosamente estas espécies, preferencialmente de um modo rápido e prático.

São várias as técnicas utilizadas hoje em dia para a detecção e quantificação de compostos de TBT, nomeadamente cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC), captura criogénica, extracção por fluído supercrítico ou micro-extracção em fase sólida (SPME) com um sistema específico de detecção, tal como espectrometria de absorção atómica (AAS), espectrometria de absorção molecular, espectrometria de emissão atómica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), cromatografia gasosa com detector de emissão atómica por plasma induzido por microondas (GC-MID-AED). Também se pode encontrar referência a métodos de detecção não específica, tal como fotometria de chama (FPD) [Schulze & Lechmann, 1994; Szpunar-Lobinska et al., 1995; Quevauviller, 1996; Smaele et al., 1999; Ochsenkün et al., 2001]. A maioria das técnicas referenciadas na literatura implica uma etapa de derivatização das espécies organoestanhosas em compostos mais voláteis de modo a poderem ser analisadas [Szpunar-Lobinska et al., 1995; Ochsenkün et al., 2001; Santalla, 2008]. As técnicas anteriormente referidas são dispendiosas e o tempo de análise é longo. Deste modo, é imperativo procurar outras soluções analíticas alternativas às actualmente utilizadas.

As técnicas voltamétricas podem ser uma boa solução para este “problema”. Não necessitam de passos de derivatização, são fáceis de manusear, exactas, reprodutivas e rápidas [Booth & Fleet, 1970; Hasebe et al., 1982; Kenis & Zirino, 1983; Bond & McLachlan, 1988; Ochsenkuéhn-Petropoulou et al., 1992; Bond et al., 1995; Ochsenkün et al., 2001]. No entanto, a aplicação de técnicas voltamétricas aos compostos organoestanhosos, nomeadamente ao TBT, é afectada por diversas variáveis, nomeadamente a natureza e a concentração do electrólito de suporte, o pH, as condições em que são efectuados os varrimentos, entre outras, uma vez que estes factores interferem com o comportamento electroquímico do TBT. A electroquímica básica dos compostos n-butilestanho pode ser resumida pela equação:





A esta reacção podem ser acopladas reacções envolvendo os aniões do electrólito de suporte, o que vai obviamente afectar a qualidade e tipologia do sinal obtido [Bond et al., 1995].

Segundo Bond e colaboradores [Bond et al., 1995], a análise de amostras de água através da determinação voltamétrica directa não é exequível, seja por interferências por parte do electrólito de suporte, seja por diversos outros problemas, nomeadamente a existência de outras substâncias que competem com os compostos organoestanhosos, mais especificamente com o TBT, no que respeita aos processos de adsorção associados ao eléctrodo de mercúrio. É então objectivo deste projecto encontrar uma solução para estes problemas. Para tal propõe-se a utilização de aplicações da área da quimioinformática com o intuito de modelar as diversas variáveis em jogo, de forma a encontrar a melhor combinação de variáveis e perceber a natureza da tendência dos resultados obtidos através de métodos voltamétricos, mais concretamente da voltametria de onda quadrada (SWV) na versão de redissolução anódica (SWASV).

## Inteligência Artificial

A Inteligência Artificial é um tema que há muito ocupa o tempo de investigadores um pouco por todo o mundo. Um sistema artificial que consiga substituir o cérebro humano e até mesmo ultrapassá-lo é um mistério ainda muito bem guardado, ao qual nenhum Ser Humano conseguiu aceder. No entanto, muitos são já os sistemas artificiais que conseguem de forma inteligente desenvolver determinadas tarefas. Em definição, a Inteligência Artificial é uma área de pesquisa da ciência da computação que se dedica a procurar métodos e/ou dispositivos computacionais que possuam ou simulem a capacidade humana de resolver problemas, pensar ou, de uma forma mais ampla, ser inteligente. Esta área começou a ser desenvolvida após a Segunda Guerra Mundial. Os métodos e dispositivos computacionais inteligentes têm sido aplicados em várias áreas do saber, nomeadamente na Química. Nos últimos 30 anos desenvolveu-se uma área da ciência conhecida por Quimioinformática. É uma área interdisciplinar que envolve, naturalmente, a Química e a Informática e que consiste na utilização de técnicas computacionais visando a descoberta de conhecimento químico. Esta abrange diversas áreas tais como representação de estruturas, manipulação de reacções químicas, processamento e análise de dados, quimiometria, *data mining*,



entre outros. Os métodos da quimioinformática têm sido aplicados com sucesso em todos os campos da química [Esteban et al., 2006; Gasteiger, 2006; Torrecilla et al., 2007; Ni & Kokot, 2008]. A electroquímica tem beneficiado bastante com a aplicação de técnicas quimiométricas, incrementando a sua aplicabilidade no que respeita à predição quer qualitativa quer quantitativa de vários analitos em simultâneo [Ni & Kokot, 2008]. Os métodos mais utilizados incluem redes neuronais artificiais (RNA), algoritmos genéticos (AG), entre outros. As técnicas quimiométricas têm sido utilizadas em conjunto com técnicas voltamétricas com o intuito de resolver problemas associados à determinação voltamétrica de determinadas espécies [Ensafi et al., 2002; Esteban et al., 2006; Gasteiger, 2006; Cabanillas et al., 2007].

Avanços recentes em neurofisiologia e novas técnicas experimentais têm proporcionado um aumento do conhecimento da anatomia e funcionamento do cérebro humano. Valendo-se destes novos conhecimentos, modelos matemáticos e algoritmos computacionais têm sido projectados para simular este funcionamento. Assim, por definição, RNA é o nome dado ao conjunto de métodos matemáticos e algoritmos computacionais desenvolvidos no sentido de simular o processamento de informação e aquisição do conhecimento pelo cérebro humano. Consiste numa interligação entre grupos de neurónios artificiais e processa a informação utilizando uma abordagem conexionista. Na maioria dos casos, uma RNA é um sistema adaptativo que altera a sua estrutura em função de informações externas e/ou internas que chegam à rede durante a fase de aprendizagem. Em termos mais práticos, uma rede neuronal é uma ferramenta não-linear de modelação de dados [Veelenturf, 1995; Ensafi et al., 2002; Galushkin, 2007]. As RNAs têm-se revelado ferramentas poderosas no reconhecimento de padrões, ultrapassando outras técnicas quer em fiabilidade quer em velocidade de processamento.

Um algoritmo genético (AG) é uma técnica de pesquisa, utilizada em computação, com o intuito de descobrir soluções exactas ou aproximadas, de forma a otimizar um processo ou a encontrar as soluções para um determinado problema. Os AGs são categorizados como heurísticos de pesquisa global. São uma classe particular de algoritmo evolucionário que utiliza técnicas inspiradas na evolução biológica, tais como a hereditariedade, mutação, selecção e cruzamento [Chambers, 2001; Emmert-Streib & Dehmer, 2008].

## Objectivos

Este trabalho tem por objectivos:

- (i) Caracterizar e determinar, electroquimicamente, o tributilestanho em amostras biológicas e não biológicas usando voltametria de onda quadrada de redissolução anódica com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa;
- (ii) Determinar as condições ideais para a aplicação da técnica escolhida, nomeadamente natureza e concentração do electrólito de suporte, pH, frequência, tempo de equilíbrio, amplitude e intervalo de potencial;
- (iii) Aplicar e caracterizar técnicas oriundas da área científica da Inteligência Artificial, mais concretamente redes neuronais artificiais, com o intuito de modelar fenómenos não lineares complexos e tratar informação incompleta e/ou com ruído.

Com este projecto pretende-se desenvolver uma técnica de quantificação do TBT, baseada em técnicas voltamétricas acopladas a técnicas oriundas da área da Inteligência Artificial, com o objectivo de resolver os problemas detectados por outros autores, nomeadamente a não linearidade na resposta do poluente a técnicas electroquímicas. Este trabalho torna-se ainda mais pertinente tendo em conta o facto de existirem muito poucos trabalhos publicados acerca da determinação deste composto por técnicas electroquímicas.

## Inovação e Valor Acrescentado

A qualidade do meio ambiente constitui um dos principais objectos de estudo por parte de cientistas de todo o mundo e a sua importância tem vindo a crescer largamente nas últimas duas décadas. A análise ambiental engloba o conhecimento das propriedades do ar, água e solos, o que constitui um tópico imensamente importante, uma vez que todos os seres vivos utilizam estes três elementos de forma intensa. Na literatura pode-se encontrar frequentemente aplicações da



quimiometria a dados relacionados com a qualidade do meio ambiente que evidenciam um impacto significativo na qualidade e facilidade com que se efectuam as análises. A análise quimiométrica é utilizada com sucesso em diversas técnicas analíticas, nomeadamente em técnicas electroquímicas, as quais serão a principal ferramenta neste trabalho.

De uma forma geral, os métodos electroquímicos são altamente competitivos para a análise de metais quando comparados com outros métodos analíticos. Isto deve-se ao facto de serem relativamente rápidos, baratos, com baixos limites de detecção, possibilitarem a análise simultânea de vários grupos de elementos e a realização de análises *on-site* e *in-situ*, devido à portabilidade do equipamento. Por outro lado, para a análise de compostos orgânicos, os métodos electroquímicos competem com técnicas como o HPLC ou a popular espectrometria de massa. A literatura está repleta de trabalhos que descrevem a utilização de métodos electroquímicos na análise de uma vasta gama de iões metálicos com diversas concentrações e aplicando diferentes métodos [Ni & Kokot, 2008]. No entanto, quando se procura artigos electroquímicos relacionados com a determinação quantitativa de compostos organoestanhosos, nomeadamente o TBT, deparamo-nos com uma imensa escassez de informação. Segundo Bond e seus colaboradores [Bond et al., 1995], a determinação voltamétrica directa, em amostras reais, de compostos organoestanhosos utilizando eléctrodos de mercúrio não é exequível uma vez que a electroquímica destes compostos é complexa. A natureza do electrólito de suporte afecta significativamente as reacções electroquímicas, bem como o tempo da análise. Análises mais longas mostram que ocorrem reacções de troca de grupos butilo com o eléctrodo de mercúrio e reacções de polimerização que vão aumentar a complexidade da electroquímica. No caso de existirem diferentes compostos organoestanhosos, os processos que ocorrem para cada um deles individualmente vão interferir entre si. Além disto, em amostras naturais existem outros compostos metálicos que vão competir com os organoestanhosos no que respeita aos processos de adsorção associados ao eléctrodo de mercúrio. Além de todas estas dificuldades, ainda que em ambiente controlado, o TBT não responde linearmente às técnicas voltamétricas, impossibilitando traçar uma curva de calibração para a quantificação do mesmo.

Actualmente, a determinação e quantificação de compostos organoestanhosos implica processos de separação, de derivatização e a utilização de técnicas complexas, morosas e dispendiosas. Ricardo Santalla [Santalla, 2008], na sua dissertação de mestrado, descreve um método de determinação e quantificação do TBT, combinando o método de extracção adsorptiva em barra de agitação, com





derivação *in situ* usando  $\text{NaBH}_4$ , seguida de desadsorção líquida e análise por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa no modo de monitorização de iões seleccionados (SBSE( $\text{NaBH}_4$ ) *in situ*-LD/GC-MS(SIM)). Esta técnica proposta prevê, só para o passo de derivatização, um tempo de 60 minutos. É uma técnica que permite obter resultados válidos mas que implica despende muito tempo para a determinação e quantificação do TBT. Desta forma, este trabalho pretende desenvolver um procedimento que, conjugando a quimioinformática com a voltametria de onda quadrada de redissolução anódica com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, possibilite a determinação e quantificação do TBT de uma forma rápida e directa. Este método possibilitará a quantificação de amostras em poucos minutos, utilizando equipamentos económicos e técnicas de preparação das amostras de fácil execução.

## Organização da Dissertação

A dissertação encontra-se organizada em seis capítulos, não estando nesta contagem contabilizados a introdução, as referências bibliográficas e os anexos.

Na introdução procura-se dar uma visão geral de toda a dissertação, abordando sumariamente os grandes eixos que a orientam.

O primeiro capítulo, intitulado Química do Tributilestanho, apresenta o analito em estudo, fazendo uma síntese das suas propriedades físico-químicas, dos métodos analíticos reportados na literatura para o quantificar, das fontes que o introduzem no meio ambiente e das quantidades que já têm sido detectadas em várias matrizes. Apresentam-se também alguns efeitos provocados em seres vivos, nomeadamente no Ser Humano, que se encontram vulgarmente reportados na literatura.

O segundo capítulo é referente aos métodos electroquímicos, fazendo uma breve revisão dos métodos mais utilizados mas centrando-se essencialmente na voltametria de onda quadrada de redissolução anódica, pois foi este o método electroquímico seleccionado para estudar o TBT.

O capítulo terceiro está relacionado com a Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados (DCBD). Apresenta uma revisão acerca de modelos e técnicas de *data mining*, focando-se mais fortemente na técnica que foi seleccionada para se aliar à voltametria de onda quadrada de redissolução anódica, isto é, nas redes

neuronaes artificiaes. Neste capítulo faz-se também referência a técnicas de avaliação dos modelos gerados.

No quarto capítulo descreve-se toda a parte experimental utilizada para o desenvolvimento deste trabalho, nomeadamente todo o equipamento, materiais e reagentes utilizados, preparação de soluções, condições electroquímicas experimentais e funcionamento do *software* utilizado para a DCBD.

No capítulo quinto apresentam-se, interpretam-se e analisam-se os resultados e os modelos de RNA obtidos, seja no que respeita aos dados adquiridos para compreender a resposta electroquímica do TBT e posteriormente seleccionar as condições ideais para realizar os varrimentos, seja no que concerne aos que possibilitaram a obtenção de picos de intensidade de corrente cujas características foram depois utilizadas para construir a base de dados que serviu de suporte ao treino da RNA utilizada para a quantificação de TBT.

O sexto e último capítulo contem as conclusões finais e as potenciais ideias para o desenvolvimento de trabalho futuro, baseado no desenvolvido nesta dissertação.

## Capítulo I

*"Tributyltin is a highly toxic biocide that has been used extensively to protect the hulls of large ships."*

Geoffrey H. Grubbs  
Office of Science and Technology  
U. S. Environmental Protection Agency

### Química do Tributilestanho

O tributilestanho (TBT) e os compostos organoestanhosos constituem um grave problema ambiental pois são extremamente tóxicos para diferentes organismos vivos. A sua toxicidade manifesta-se, por exemplo, sob a forma de alterações patológicas como o impossexo (mutação, causada por poluentes, que origina o surgimento de caracteres sexuais masculinos, tais como o pénis e o canal deferente, em fêmeas) em moluscos gastrópodes e a imunossupressão em caracóis e bivalves. Esta toxicidade tem ainda a capacidade de ser persistente [Dobson & Cabridenc, 1990; Walker, 2009].

Em ambientes aquáticos os efeitos tóxicos do TBT são mais visíveis uma vez que este composto foi largamente utilizado na protecção dos cascos de grandes navios. A função desta utilização era impedir a fixação de organismos nos cascos, uma vez que este funciona como biocida para muitos moluscos e outros organismos aquáticos.

#### I.1. Propriedades Físicas e Químicas do TBT

O estanho é um metal que apresenta elevada tendência a formar ligações covalentes com grupos orgânicos. Efectivamente, os compostos organoestanhosos são compostos nos quais um átomo de estanho se liga a um, ou até quatro radicais orgânicos através de ligações covalentes carbono-estanho (C-Sn). Nos casos em que existem menos do que quatro ligações C-Sn o catião organoestanhoso pode ligar-se com outros aniões, nomeadamente o acetato, carbonato, cloreto, fluoreto, hidróxido, óxido ou sulfureto. A fórmula geral dos compostos de TBT é  $(C_4H_9)_3Sn-X$ , (onde o X representa um anião) [EPA, 2003].

Em termos comerciais, o TBT encontra-se maioritariamente disponível sob a forma de óxido de TBT (TBTO), com uma pureza abaixo dos 96%. As principais impurezas que se encontram são derivados de dibutilestanho e, mas em menor percentagem, o tetrabutilestanho. O óxido de TBT é incolor, possui um odor muito característico e uma densidade relativa entre 1,17 e 1,18 g.cm<sup>-3</sup>. A solubilidade em água é bastante reduzida, variando entre 1,0 e 100 mg/L, de acordo com o pH, temperatura e aniões presentes na água (facto que determinará a especiação). Desta forma, é muito difícil solubilizar o TBT em água. A solubilidade deste composto, no entanto, aumenta em solventes orgânicos, como é o caso do metanol ou do etanol. O óxido de TBT é inflamável mas não forma misturas explosivas com o ar. Este é também um dos compostos mais importantes do ponto de vista ecotoxicológico [Dobson & Cabridenc, 1990; Walker, 2009].

Na água do mar e sob condições normais, existem três formas de TBT (hidróxido, cloreto e carbonato), as quais permanecem em equilíbrio. Para valores de pH inferiores a 7, as formas predominantes são  $\text{Bu}_3\text{SnOH}_2^+$  e  $\text{Bu}_3\text{SnCl}$ . A pH 8 coexistem as formas  $\text{Bu}_3\text{SnCl}$ ,  $\text{Bu}_3\text{SnOH}$  e  $\text{Bu}_3\text{SnCO}_3^-$  e a pH superior a 10 predominam as formas  $\text{Bu}_3\text{SnOH}$  e  $\text{Bu}_3\text{SnCO}_3^-$  [Dobson & Cabridenc, 1990]. O TBTO é fortemente adsorvido em matéria particulada.

## I.2. Métodos analíticos

Muitos são os métodos analíticos que permitem determinar quantitativamente derivados do tributilestanho em águas, sedimentos ou biota. Segundo Dobson e colaboradores o mais comum era a espectrometria de absorção atómica. Quando utilizado o atomizador de chama, os limites de detecção eram de 0,1 mg/L. Utilizando a câmara de grafite obtinham-se limites de detecção que variavam entre 0,1 e 1,0 µg/L. Estes métodos, no entanto, carecem sempre de uma fase de extracção/separação e formação de derivados voláteis. A separação desses derivados voláteis é comumente feita através de GC [Dobson & Cabridenc, 1990]. Além disso a utilização da câmara de grafite implica o seu revestimento para evitar a percolação e consequente perda do TBT [Ferro, 2002].

Desde 1990 até a esta data não se verificou uma grande evolução nas técnicas analíticas aplicadas à quantificação destes compostos. Apenas foi introduzida a espectrometria de massa enquanto método de detecção e quantificação mas necessitando sempre das etapas de preparação da amostra e

separação dos seus componentes. Mais recentemente foi publicado um artigo onde se relata um método capaz de determinar simultaneamente o mono-, di- e tributilestanho em amostras de água, sedimentos e tecidos de moluscos, utilizando diluição isotópica da amostra e analisando-a através de GC-MS. No entanto, verifica-se que continuam a ser necessários passos muito morosos de extracção e derivação dos compostos organoestanhosos [Centineo *et al.*, 2007].

Além das já referidas, encontra-se ainda referência a ICP-MS, após extracção com CG ou HPLC. No entanto e como é sabido, esta técnica é dispendiosa e nem sempre está disponível nos laboratórios de análise química ambiental.

No que respeita aos métodos espectrais atómicos, quer de absorção quer de emissão, não se consegue determinar directamente o TBT. Estes métodos consistem na determinação de uma espécie, que neste caso seria o estanho atómico. Como se percebe o estanho presente numa amostra real pode ser proveniente não só do TBT como dos seus derivados ou até mesmo de estanho iónico ( $\text{Sn}^{2+}$ ) que possa ter sido introduzido por outra via.

### I.3. Fontes de Poluição Ambiental

O estanho não é um metal muito tóxico. Aliás, o estanho elementar é utilizado com alguma regularidade na superfície interior das latas utilizadas para armazenar alimentos. No entanto, os compostos orgânicos de estanho, tais como o TBT, são altamente tóxicos.

Algas, limo, fungos, crustáceos, diatomáceas e outros organismos costumam fixar-se aos cascos dos navios oceânicos, provocando um decréscimo na velocidade máxima, aumentando o consumo de combustível e diminuindo a manobrabilidade dos mesmos. Na década de 70 foram introduzidas na indústria naval as tintas anti-incrustantes, com o objectivo de que estes organismos vivos não se fixassem nos cascos dos navios. Estas tintas tinham na sua constituição compostos organoestanhosos, especialmente tributilestanho. Efectivamente os cascos dos navios tornaram-se muito mais limpos. O que aparentemente parecia uma boa solução tornou-se, infelizmente, numa fonte de poluição uma vez que a água vai lixiviando o TBT da tinta, transferindo-o para as massas de água que o transportam e disseminam por todos os seres vivos [Hill, 2004].

Além da larga utilização do TBT nos cascos das embarcações, este composto foi também identificado em outros objectos de utilização marítima, nomeadamente

utensílios de pesca, como por exemplo bóias, redes e gaiolas de pesca e cais para barcos. Estes compostos foram utilizados também na preservação de madeira, como microbiocidas em marcenaria, como biocidas em sistemas de refrigeração, fábricas de celulose e de papel, de cerveja, de curtumes e de têxteis [Dobson & Cabridenc, 1990]. A presença de TBT em tintas foi praticamente banida nos dias que correm. No entanto, muitas são as embarcações que ainda têm nos seus cascos TBT. Além disso, as outras aplicações deste composto continuam ainda em utilização em alguns países, não estando a utilização do mesmo regulamentada.

#### I.4. Restrições de Utilização

Um pouco por todo o mundo os países estão a tomar medidas de forma a diminuir os níveis de TBT no ambiente. As restrições variam de país para país mas, na sua maioria, todos proibiram a utilização de tintas contendo TBT em barcos com menos de 25 metros. Alguns países permitem que barcos com casco de alumínio utilizem TBT para a sua protecção uma vez que a maior parte das alternativas contém formas de cobre que provocam a corrosão do alumínio [Dobson & Cabridenc, 1990; RCPI et al., 2007].

Na sequência das evidências científicas adquiridas ao longo dos anos, que confirmam a elevada toxicidade dos compostos de TBT, a Comunidade Europeia proibiu a utilização de tintas contendo TBT em embarcações com menos de 25 metros de comprimento e a utilização de tintas com uma taxa de lixiviação de TBT superior a  $1,6 \mu\text{g Sn.cm}^{-2}$  por dia (directiva 89/677/CEE). Esta medida foi transportada para o direito interno de cada um dos estados membro em diferentes datas, sendo que em Portugal foi transportada pelo Decreto-Lei 54/93 de 26 de Fevereiro de 1993.

Em Outubro de 2002 o Canadá emitiu uma lei na qual impunha restrições à utilização de todas as tintas anti-incrustantes feitas à base de TBT. O fornecedor deste tipo de tintas concordou em receber todo o *stock* não vendido de forma a garantir que não haveria à venda nenhuma unidade desta tinta a partir de Janeiro de 2003. As razões que levaram o Canadá a tomar esta iniciativa são de cariz ambiental pois existiam e existem preocupações em relação aos organismos aquáticos, nomeadamente pelo facto destes compostos serem bioacumuláveis e persistentes no ambiente [RCPI et al., 2007].

A partir de 1 de Janeiro de 2003, a Comissão Europeia, dando seguimento ao acordo estabelecido na Conferência do Rio, na qual foi adoptado o "Princípio de Precaução" relativamente ao uso deste biocida, proibiu totalmente o uso de tintas contendo TBT e de produtos que evitam a fixação de organismos nas embarcações utilizadas em águas marinhas, costeiras, estuarinas, fluviais e em lagos. Foi também proibido o seu uso em qualquer equipamento de pesca ou que esteja total ou parcialmente submerso bem como em processos industriais de tratamento de águas [RCPI et al., 2007].

## **I.5. Concentração no Ambiente**

Vários estudos revelam que os níveis de TBT na água, sedimentos e biota são mais elevados em zonas próximas de marinas, portos comerciais, sistemas de refrigeração e de redes e jaulas de pesca tratadas com tintas à base de TBT.

Na literatura pode-se encontrar referência a níveis de TBT que chegam a atingir 1,58 µg/L em água do mar e estuários, 7,1 µg/L em água doce, 26300 µg/kg nos sedimentos costeiros, 3700 µg/kg dos sedimentos de água doce, 6,39 mg/kg nos bivalves, 1,92 mg/kg em gastrópodes e 11 mg/kg em peixes. No entanto, estas concentrações máximas de TBT não devem ser tomadas como representativas porque existem uma série de factores que podem dar origem a valores anormalmente elevados (por exemplo as partículas de tinta nas águas e sedimentos) [Dobson & Cabridenc, 1990], uma vez que a solubilidade deste composto é muito reduzida.

A literatura refere também que as concentrações de TBT medidas em amostras retiradas da superfície, tanto de água doce como de água salgada, são até duas ordens de grandeza superiores às medidas logo abaixo da superfície. Assim sendo, deve ter-se em conta que a concentração de TBT pode ser altamente influenciada pelo método de amostragem [Dobson & Cabridenc, 1990].

### **I.5.1. Água salgada e sedimentos marinhos**

Waldock e Miller mediram os níveis de TBT em amostras de água recolhidas mensalmente durante o ano de 1982 em Burnham-on-Crouch, na costa Este do Reino Unido. Estes encontraram um aumento da concentração de TBT no mês de Maio, altura do ano em que os barcos eram pintados de fresco. Encontraram

também um segundo aumento no mês de Agosto, altura do ano em que os barcos eram repintados para o maior evento do ano organizado por e para marinheiros. Neste período as tintas utilizadas continham uma quantidade significativa de TBT [Waldock & Miller, 1983].

Em torno da costa dos Estados Unidos da América e da Dinamarca, os níveis mais elevados de TBT também se encontram associados a zonas de grande afluência de embarcações, concretamente a marinas e portos destinados a embarcações de recreio de pequeno porte [Grovhoug et al., 1986; Seligman et al., 1986; Jensen & Cheng, 1987]. Stallard e seus colaboradores analisaram águas e sedimentos da costa da Califórnia. Foram encontrados elevados níveis de TBT (0,6  $\mu\text{g/L}$  na água e 23  $\mu\text{g/kg}$  nos sedimentos) perto das marinas. Os níveis de TBT eram inferiores noutras zonas costeiras e os níveis mais baixos encontrados foi em mar aberto [Stallard et al., 1987].

Muitos outros autores apresentam trabalhos onde reportam os resultados de medições de níveis de TBT em águas e sedimentos sendo que em todos é comum o facto de se observar um maior nível de TBT em áreas onde o tráfego de embarcações é elevado. De notar que o nível das marés e a turbidez da água influenciam a concentração de TBT em determinados locais [Dobson & Cabridenc, 1990; Kim et al., 2011].

### **1.5.2. Água doce e sedimentos**

Análises efectuadas nos Grandes Lagos, na América do Norte, a compostos de TBT revelaram níveis frequentemente comparáveis e, em muitos casos, níveis superiores àqueles que eram encontrados em estuários. Tal como na água salgada, também neste caso se verificou que as amostras retiradas da superfície apresentavam níveis superiores às amostras recolhidas depois da camada superficial. O TBT foi encontrado nos Grandes Lagos e em rios em níveis superiores aos que provocam danos em trutas [Maguire et al., 1982; Maguire, 1984; Maguire et al., 1985; Maguire et al., 1986; Maguire & Tkacz, 1987].

No Reino Unido, amostras de água doce recolhidas perto de um estaleiro de navios continham 3,2  $\mu\text{g/L}$  de TBT [Waldock, 1989]. No lago Zurique e em rios Suíços os níveis encontrados eram muito inferiores, na ordem de 0,015  $\mu\text{g/L}$  [Muller, 1987].



### I.5.3. Águas Residuais

Os níveis de mono-, di- e tributilestanho contido nas águas residuais, que entram numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR) na Suíça, foram medidos e o seu destino foi monitorizado através de vários processos de liquidação, digestão e filtração do lixo. As concentrações de MBT, DBT e TBT encontradas foram, respectivamente, 170, 152 e 155 ng/L, em média, após três dias de monitorização. Cerca de 90% dos compostos organoestanhosos encontravam-se presentes na matéria particulada, estando os restantes 10% em solução [Fent, 1989; Fent et al., 1989].

### I.5.4. Biota

Alzieu analisou as ostras do Pacífico (*Crassostrea gigas*) no que diz respeito aos níveis de estanho total na sequência de problemas que ocorreram na indústria francesa no final da década de 70. Este autor relatou que a maior parte do estanho é acumulado na glândula digestiva e nas brânquias destes bivalves. Valores mais elevados foram encontrados em ostras da Baía de Arcachon (resíduos na glândula digestiva e braquial com valores de, respectivamente, 7,03 e 17,37 mg/kg). Esta baía é uma zona de grande movimento de barcos de recreio de pequeno porte [Alzieu, 1981]. Em 1984, num outro artigo, este autor juntamente com Heral relataram que os níveis de estanho encontrados em ostras que se encontravam junto de uma marina eram de 110 mg/kg [Alzieu & Heral, 1984].

Existem diferenças sazonais nos níveis quer de TBT quer de DBT encontradas em mexilhões (*Mytilus edulis*). Tem sido sugerido que estas diferenças são predominantemente devidas às mudanças na actividade náutica, afectando a disponibilidade de TBT para os organismos mas também devido a diferenças fisiológicas entre os animais em diferentes épocas do ano [Page, 1989].

Muitos outros exemplos poderiam ser aqui apresentados. Existem inúmeros artigos que analisam a concentração de TBT em vários tipos de ambientes. Porém, e de uma forma pouco exaustiva, quer-se reforçar a ideia de que, de facto, junto de zonas de grande densidade de embarcações, os níveis de TBT são sempre mais elevados, devido à presença de compostos de TBT nas tintas utilizadas para revestir os cascos dos navios.

## I.6. Transporte e Transformação no Ambiente

Devido às suas propriedades físico-químicas, o TBT introduzido nas águas naturais será parcialmente adsorvido por partículas. Efectivamente, quando o TBTO é libertado em águas, uma porção considerável é adsorvida pelos sedimentos, tal como seria de esperar pela sua lipofilicidade. Vários estudos têm mostrado que entre 10 a 95% do TBTO adicionado às águas superficiais aparecem ligados aos sedimentos [Walker, 2009]. Os dados quantitativos variam devido às condições experimentais tais como salinidade, concentração e teor em matéria orgânica nas partículas. Uma vez adsorvido pelos sedimentos, o decréscimo de concentração de TBT nesta fase ocorre apenas por degradação. Sabe-se que a taxa de degradação do TBT em sedimentos é mais baixa do que na água, especialmente em condições anaeróbias. Apesar de ocorrer degradação abiótica, este processo revela-se pouco importante quando comparado com a acção biológica [Dobson & Cabridenc, 1990].

As propriedades lipofílicas do TBTO contribuem para a bioacumulação em organismos aquáticos, nomeadamente nos moluscos. Estudos de campo e de laboratório confirmam este facto. No entanto, não é ainda claro como é que os processos de adsorção complicam os resultados. A bioacumulação, em todos os organismos estudados, deve-se, pelo menos em parte, à concentração de TBT na água. A eliminação do TBT dos organismos ocorre quando estes deixam de estar expostos a compostos de TBT.

Quer seja directamente descarregado para o meio ambiente ou progressivamente difundido através da degradação da tinta dos cascos dos barcos, de gaiolas ou de redes de pesca (de 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), o TBTO entra no ambiente e fica sujeito a transformações resultantes de processos físico-químicos e bioquímicos [Dobson & Cabridenc, 1990; Heijst, 1999].

## I.7. Cinética e Metabolismo

Nos mamíferos, o TBT é absorvido nos intestinos (20-50% dependendo do veículo) e através de contacto cutâneo. Pode ser transferido para o feto através da barreira placentar. A distribuição pelos tecidos faz-se de uma forma rápida e ampla, especialmente atacando o fígado e os rins [Dobson & Cabridenc, 1990].

Nos mamíferos os metabolitos são detectáveis no sangue três horas após ter sido administrado o TBT. Em organismos inferiores, particularmente nos moluscos, a metabolização do TBT é mais lenta, o que faz com que a capacidade que estes têm para bioacumular o TBT seja muito superior à dos mamíferos [Dobson & Cabridenc, 1990; Heijst, 1999].

Em morganhos os compostos de TBT são hidroxilados pelo ataque da enzima microsomal monooxigenase [Dobson & Cabridenc, 1990]. A hidroxilação pode ocorrer quer no carbono alfa quer no carbono beta do grupo butilo [Walker, 2009].

Os compostos de TBT inibem a fosforilação oxidativa e alteram a estrutura e a função das mitocôndrias. Interferem ainda na calcificação das conchas das ostras [Dobson & Cabridenc, 1990].

## I.8. Efeitos em Microorganismos

O TBT é tóxico para os microorganismos e é utilizado de forma comercial para controlar bactérias e fungos. As concentrações necessárias para provocarem efeitos tóxicos variam bastante de espécie para espécie. A maioria dos testes com microorganismos usam culturas de grupo e, nestes sistemas, a concentração de TBT em solução pode declinar rapidamente. Tais testes podem, portanto, subestimar a verdadeira toxicidade.

No que respeita a bactérias e fungos, segundo Boorman e Plum, o TBT é mais tóxico em bactérias *gram* positivas, tais como a *staphylococcus aureus*, do que em bactérias *gram* negativas, como é o caso da *Escherichia coli*. A concentração inibitória mínima testada por estes autores em quatro espécies de fungos (*Botrytis*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizopodium*) varia entre 0,5 e 1,0 mg/L, utilizando acetato de TBT. Foram realizados outros testes, por estes e outros autores, onde se verificou efectivamente uma inibição do crescimento dos microorganismos depois da incubação [Boorman & Plum, 1975]. Soracco e Pope investigaram também a acção de compostos de TBT em diversas actividades fisiológicas e bioquímicas da bactéria *Legionella pneumophila*, o organismo causador da doença do Legionário, que vive comumente na água de sistemas de refrigeração. Estes autores determinaram que os efeitos do TBT em culturas de bactérias dependem da densidade celular. A sua eficiência é reduzida quando a densidade celular é elevada [Soracco & Pope, 1983].

Verificou-se que os compostos de TBT inibem também o crescimento de algas quer de água doce quer de água salgada. Na literatura da especialidade podem encontrar-se diversos artigos que relatam os efeitos provocados nestes microorganismos quando expostos a compostos de TBT. As concentrações relatadas na literatura variam consoante o microorganismo considerado.

## **I.9. Efeitos em Organismos Aquáticos**

### **I.9.1. Plantas aquáticas**

Na literatura internacional poucos são os estudos que se conseguem encontrar acerca dos efeitos do TBT em organismos aquáticos. No que respeita a plantas, os níveis mais baixos de LD<sub>50</sub> foram observados para a *Enteromorpha intestinalis*. Os estudos efectuados determinaram mais uma vez que o TBT e alguns compostos dele derivados são letais para este tipo de organismos vivos. Em 1984, Davies e os seus colaboradores publicaram um artigo onde mostram um estudo sobre o efeito de vários compostos de TBT no desenvolvimento dos esporos da macro-alga *Enteromorpha intestinalis*. Os autores deste artigo afirmam que a toxicidade dos vários compostos de TBT parece ser influenciada pelo tipo de anião que se encontra ligado a este. Verificaram ainda que a sensibilidade decresce com o aumento do tempo de colonização [Davies et al., 1984].

Floch e seus colaboradores submeteram plantas aquáticas de água doce a óxido de TBT e a acetato de TBT durante dez dias, fazendo variar a concentração dos compostos de TBT entre 0,03 e 1,2 mg/L. Verificou-se algum crescimento das plantas para concentrações de óxido de TBT de 0,03 mg/L. Com concentrações superiores a 0,5 mg/L as plantas morriam [Floch et al., 1964].

### **I.9.2. Invertebrados aquáticos**

No que respeita à toxicidade aguda em invertebrados aquáticos, estudos efectuados consideram que estes, no estado larval, são mais sensíveis aos compostos de TBT do que os mesmos em fase adulta. A ostra do Pacífico, em estado larval, apresenta uma LD<sub>50</sub> de 1,6 µg/L, para um tempo de exposição de 48 horas. No que diz respeito à mesma espécie mas em fase adulta, verificou-se que a

LD<sub>50</sub> aumenta para 1800 µg/L [Thain, 1983]. Outras espécies revelam diferenças similares entre estes estágios de vida. Os dados existentes acerca dos efeitos dos compostos de TBT nestes organismos são escassos mas todos apresentam uma característica em comum: os compostos de TBT apresentam uma toxicidade notoriamente elevada para estes organismos [Dobson & Cabridenc, 1990].

### I.9.3. Moluscos

Estudos em moluscos de água doce revelam que, tal como para os invertebrados, estes são mais sensíveis aos compostos de TBT em fase jovem do que em fase adulta. Experiências com *Biomphalaria sudanica* e *Bulinus nasutus*, duas espécies africanas de caracóis marinhos, evidenciaram exactamente este resultado, quando expostas a acetato de TBT [Webbe, 1963]. Já é possível encontrar mais dados acerca da toxicidade provocada pelos compostos de TBT em moluscos de água salgada, especialmente em bivalves comercialmente importantes. Constatou-se, na maior parte dos estudos, que os derivados do TBT causam efeitos sub-letais mesmo com concentrações relativamente reduzidas. Confirmou-se experimentalmente que o TBT afecta a deposição da concha de ostras em crescimento, o desenvolvimento dos órgãos sexuais, o género de ostras adultas, o seu crescimento, entre outros problemas detectados [Dobson & Cabridenc, 1990].

### I.9.4. Peixes

A toxicidade aguda em peixes de água doce e de água salgada é muito variável. Estudos efectuados revelam que a LD<sub>50</sub> varia entre 1,5 e 240 µg/L. A LD<sub>50</sub>, para um período de exposição de 96 horas a óxido de TBT de peixes de água salgada, varia entre 1,5 e 36 µg/L. Considerando os resultados de um número significativo de estudos, constata-se que os indivíduos mais jovens são mais sensíveis aos compostos de estanho do que os indivíduos adultos [Dobson & Cabridenc, 1990].

### **I.10. Efeitos em Organismos Terrestres**

Os organismos terrestres são expostos ao TBT, nomeadamente ao óxido de TBT, devido à sua utilização enquanto agente de conservação da madeira. No entanto, na literatura, existe pouca informação disponível acerca deste tema. O óxido de TBT já provou ser tóxico para as abelhas que tem um contacto de proximidade com madeira tratada com este químico. Foi confirmada também a sua letalidade em insectos que foram expostos, quer por via tópica quer através da alimentação, a madeira tratada. A toxicidade aguda em pequenos mamíferos em estado selvagem é moderada, situando-se entre 37 e 240 mg/kg por dia [Dobson & Cabridenc, 1990].

### **I.11. Toxicidade em Mamíferos de Laboratório**

A toxicidade aguda provocada pelos vários compostos de TBT foi também estudada em mamíferos de laboratório. Os efeitos provocados por estes compostos variam de acordo com o mamífero exposto ao TBT. Verificou-se experimentalmente que o modo de administração influencia o potencial letal destes compostos. A LD<sub>50</sub>, por administração oral, varia entre aproximadamente 40 e 250 mg/kg de massa corporal. No entanto, por administração endovenosa, o seu potencial letal aumenta significativamente, provavelmente porque, por via oral, o TBT é apenas parcialmente absorvido pelo intestino. A toxicidade aguda por via dérmica é baixa. No entanto variará, naturalmente, com a área de pele exposta ao TBT, com o tempo de exposição, com a quantidade de TBT ao qual a pele é exposta e com o composto de TBT em questão [Dobson & Cabridenc, 1990].

Constatou-se que os compostos de TBT são irritantes para a pele e extremamente irritantes para os olhos. Os aerossóis de compostos de TBT são altamente tóxicos. No entanto, as misturas de TBT com ar, à temperatura ambiente, não produzem qualquer efeito sobre os mamíferos. Outros efeitos da exposição aguda incluem alterações no nível de lípidos no sangue, no sistema endócrino, no fígado e no baço e um desenvolvimento deficiente do cérebro. O significado toxicológico destes efeitos, reportados após a administração de doses únicas mas elevadas de compostos de TBT, é questionável. Os mamíferos pereceram mas a causa de morte era ainda desconhecida [Dobson & Cabridenc, 1990].

Os morganhos foram e são dos mamíferos mais utilizados nos estudos com o TBT. Para doses diárias de 320 mg/kg (aproximadamente 25 mg/kg de massa corporal), a taxa de mortalidade observada era extremamente elevada, após um tempo de exposição superior a 4 semanas. Não morreram indivíduos quando a dose diária administrada foi de 100 mg/kg (aproximadamente 10 mg/kg de massa corporal) nem após administração diária de 12 mg/kg de massa corporal, através de sonda esofágica. Em morganhos expostos logo após o nascimento, a administração de 3 mg/kg de massa corporal resultou num número elevado de mortes. Os sintomas principais da exposição a uma dose letal foram a perda de apetite, fraqueza e emagrecimento. Os efeitos limítrofes no crescimento dos morganhos foram observados após administração de 6 mg/kg de massa corporal, administrados por sonda esofágica [Dobson & Cabridenc, 1990].

Foram detectados efeitos estruturais em órgãos endócrinos, especialmente na hipófise e na tiróide, tanto em períodos de exposição curtos como longos. Foram também observadas alterações na concentração hormonal em circulação e na resposta a estímulos fisiológicos em testes de curta duração. Porém, para testes de longa duração estes efeitos não se manifestam. Não é conhecido o mecanismo de acção que leva a estes resultados [Dobson & Cabridenc, 1990].

Os compostos de TBT já provaram ser efectivamente tóxicos para uma enorme diversidade de seres vivos, tendo efeitos em diversos níveis e levando, na maior parte dos casos, à morte dos indivíduos expostos. Estas consequências variam com o tempo de exposição e com a concentração dos compostos de TBT. Pensa-se que a toxicidade dos compostos de TBT afecta o sistema imunológico. O mecanismo de acção não é conhecido mas envolve a conversão metabólica dos compostos de TBT. A resistência não específica é também afectada.

## **I.12. Efeitos nos Humanos**

Os compostos de TBT provocam no Ser Humano irritação da pele e olhos e dermatites severas após contacto directo com a pele. Não existem relatos de envenenamento por ingestão de óxido de TBT ou outros sais. No entanto, 70% dos trabalhadores de uma fábrica de borracha que utiliza óxido de TBT no processo de vulcanização reportaram irritação na parte superior do tracto respiratório e nos olhos. Cerca de 20% também experienciaram pequenos sintomas ao nível do peito (irritação, aperto e dor). Ainda assim, em nenhum dos casos foi afectada a função

pulmonar. O tempo de exposição é desconhecido [WHO/FAO, 1984]. Um indivíduo do sexo feminino, utilizando uma tinta de *spray* contendo óxido de TBT como aditivo, apresentou irritação imediata nos olhos (lacrimejamento excessivo) e na mucosa nasal. Os sintomas pioraram ao fim de 14 dias de exposição. No entanto, durante os fins-de-semana os sintomas acalmavam e, após a remoção deste aditivo das tintas, os sintomas desapareceram completamente [WHO/FAO, 1984]. Akatsuka e colaboradores relataram um caso de intoxicação ocupacional com compostos de tributilestanho onde, juntamente com os sintomas de cansaço, dor de cabeça occipital ligeira e rigidez nos ombros, houve uma perturbação marcada do sentido do olfacto. Os autores realizaram estudos em gatos para testar se esse efeito poderia ser confirmado experimentalmente. A exposição de gatos a uma mistura de vapor contendo principalmente o brometo de tributilestanho revelou uma acentuada perda do sentido do olfacto [Akatsuka et al., 1959].

#### **I.12.1. Avaliação dos riscos para a saúde humana**

A exposição de trabalhadores ocorre principalmente durante a manufatura e formulação de compostos de TBT, na aplicação e remoção de tintas e na utilização deste composto enquanto conservador da madeira. No caso da população em geral, esta pode ser exposta a estes compostos através da alimentação, particularmente através de seres vivos aquáticos como sejam peixes e marisco e pela aplicação doméstica de tintas contendo estes compostos.

Um sintoma apresentado quer por animais quer pelos humanos é a capacidade irritante do TBT na pele e nos olhos. Também está provado que estes compostos, quando inalados, provocam a irritação das vias respiratórias.

O envenenamento sistemático nunca foi reportado e a remoção dos compostos de TBT do corpo humano ocorre poucos dias após cessar a exposição aos mesmos.

Os efeitos a curto e a longo prazo em animais de laboratório estão relacionados com alterações no fígado e nos sistemas endócrino e hematológico.

Os compostos de TBT não apresentam resultados mutagénicos. Num estudo acerca do efeito carcinogénico em morganhos utilizando óxido de TBT detectou-se um crescimento de tumores endócrinos que aparecem espontaneamente com uma incidência variável e elevada. Deste modo, as evidências disponíveis não permitem demonstrar claramente a relação directa entre os compostos de TBT e o aparecimento de tumores nos morganhos [Dobson & Cabridenc, 1990].



## Capítulo II

*"Nada é tão maravilhoso que não possa existir,  
se admitido pelas leis da Natureza."*

Michael Faraday

### ***Métodos Electroquímicos***

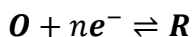
Os métodos electroquímicos, tal como o nome indicia, abarcam um grupo de métodos analíticos quantitativos que fazem uso das propriedades eléctricas mensuráveis (intensidade de corrente, potencial e carga) de um sistema e da relação que existe entre estas e a espécie química (ou características eléctricas) em análise, quando o sistema é submetido a uma diferença de potencial ou a uma passagem de corrente numa célula electroquímica. No caso particular de uma espécie química em análise (o analito), as medidas efectuadas podem então ser relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco a esta, ou que depende da presença desta. Existe uma variedade de técnicas electroanalíticas que têm sido utilizadas em várias aplicações, como na monitorização ambiental, no controlo de qualidade de produtos e processos industriais e nas análises clínicas. Entre estes métodos, as voltametrias constituem um dos conjuntos de métodos mais versáteis, mais usados e importantes. Estes métodos oferecem uma série de vantagens, nomeadamente (i) selectividade e especificidade das determinações, resultantes de processos de oxidação/redução das espécies analíticas de interesse (ou de espécies que reagem com o *analito* de um modo conhecido), num potencial aplicado específico; (ii) selectividade decorrente dos processos de oxidação/redução do analito num eléctrodo de trabalho feito com um material específico; (iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultantes das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal que proporcionam um sinal com um ruído de fundo fraco. Estes métodos apresentam ainda a vantagem de a instrumentação ser relativamente barata quando comparada com outras técnicas [Skoog et al., 2007].

## II.1. Voltametria

A voltametria, genericamente, é uma técnica electroanalítica que se baseia nos fenómenos de transferência de carga eléctrica que ocorrem na interface entre a superfície do eléctrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. É uma técnica dinâmica pois a célula electroquímica é operada na presença de corrente eléctrica que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de uma diferença potencial variável no tempo. Assim, nesta técnica, as informações acerca do analito são obtidas através da medição da magnitude da intensidade da corrente eléctrica que surge no eléctrodo de trabalho, ao se aplicar um potencial variável entre o eléctrodo de trabalho e um eléctrodo auxiliar, mas controlando rigorosamente o valor de potencial do eléctrodo de trabalho relativamente a um eléctrodo de referência ( $E_{\text{trabalho}}$  vs.  $E_{\text{Ref.}}$ ). O parâmetro ajustado e variável é o potencial do eléctrodo de trabalho ( $E_{\text{trabalho}}$ ) e o parâmetro medido é a intensidade de corrente resultante ( $i$ ). A aplicação deste potencial ao eléctrodo de trabalho origina duas fracções de corrente: uma directamente relacionada com a transferência de carga, corrente faradaica,  $i_F$ , e outra necessária para organizar as moléculas e iões presentes na dupla camada eléctrica, a corrente capacitiva,  $i_C$ . A corrente total registada é  $i_T = i_F + i_C$ .

No decorrer de uma determinação voltamétrica, como o potencial aplicado varia no tempo, a intensidade de corrente é medida em função do tempo. O registo gráfico da intensidade da corrente em função do potencial,  $i = f(E)$ , denomina-se de voltamograma.

A intensidade de corrente obtida devido à transferência de electrões durante um processo de oxidação/redução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eléctrodo e consequentemente na célula electroquímica (Equação II.1.).



*Sendo O a forma oxidada e R a forma reduzida do analito.*

**Equação II.1. – Reacção geral de oxidação/redução simples**

Um eléctrodo electricamente polarizado atrai predominantemente espécies carregadas positivamente ou negativamente que podem ou não ser electroactivas

na superfície deste. Espécies neutras também interagem com o eléctrodo via adsorção. Desta forma, as reacções que ocorrem junto ao eléctrodo são compostas por uma série de etapas. Para se descrever qualquer processo electródico devem ser considerados quer o transporte das espécies até à (ou desde a) superfície do eléctrodo, quer os fenómenos de superfície a que as espécies intervenientes estão sujeitas, ou as reacções químicas em que participam, para além da(s) reacção(ões) de transferência electrónica que ocorre(m) no eléctrodo. Assim, a corrente é governada por processos como:

- (i) transferência de massa (transferência da espécie do corpo da solução para a interface eléctrodo-superfície);
- (ii) transferência de carga (transferência de electrões na superfície do eléctrodo);
- (iii) reacções químicas que precedem ou sucedem a transferência de electrões;
- (iv) fenómenos de superfície.

Em reacções de eléctrodo em que a transferência de carga não é controlada por adsorção das espécies, é indispensável que o transporte de massa seja contínuo pois, caso contrário, a concentração da espécie electroactiva de interesse na superfície do eléctrodo irá decrescer rapidamente e de modo irregular, inviabilizando a possibilidade de poder ser relacionada com a concentração do analito no seio da solução. Existem três formas pelas quais pode ocorrer o transporte de massa: a migração, a convecção e a difusão.

Em voltametria, normalmente (excluindo o caso das voltametrias hidrodinâmicas) as condições experimentais são ajustadas para que o transporte por migração (movimento de iões através da solução, causado pela atracção ou repulsão entre as espécies iónicas em solução e o eléctrodo de trabalho electricamente polarizado) e convecção (movimento das espécies causado por perturbação mecânica ou térmica do fluxo da solução) sejam minimizados. No caso da migração, a introdução de um excesso de electrólito de suporte na solução assegura que o número de transporte do analito iónico diminua consideravelmente, passando a corrente eléctrica em solução a ser garantida maioritariamente, pelo transporte de iões provenientes do electrólito de suporte. Por outras palavras, a migração iónica em solução, motivada pelo campo eléctrico aplicado, ocorre devido

ao transporte dos iões provenientes do electrólito de suporte, que existem em maior concentração, com uma contribuição desprezável do analito iónico. Em particular, quando a razão [electrólito suporte]/[analito iónico]  $> 100$ , o transporte por convecção é minimizado cessando o distúrbio mecânico da solução (são evitados a agitação mecânica e o borbulhamento de gás), ou mantendo a temperatura da solução homogénea, antes de se aplicar o programa voltamétrico. Desta forma, em voltametria, o transporte de massa é feito essencialmente por difusão, que consiste na movimentação espontânea da espécie química entre duas regiões da solução, devido à formação de um gradiente de concentração entre estas. Por exemplo, considerando a reacção de oxidação/redução referida na Equação II.1. no sentido directo, à medida que a espécie oxidada (**O**) começa a ser reduzida, há um decréscimo da concentração de **O** na superfície do eléctrodo e, espontaneamente, surgirá um fluxo de **O** no seio da solução para junto da interface eléctrodo-solução devido ao aparecimento de um gradiente de concentração.

Para que seja possível determinar um analito por voltametria é necessário, naturalmente, que este (ou uma espécie “prova” com a qual reage de modo conhecido) seja electroactivo, isto é, que se oxide ou reduza numa determinada zona de potencial aplicado, na qual a transferência de electrões seja termodinâmica ou cineticamente favorável, criando-se assim um fluxo de electrões [Bard & Faulkner, 2001]. Nestes casos, a corrente faradaica deve ser medida num ambiente de baixo ruído, que é formado pelas correntes não-faradaicas e por correntes faradaicas provenientes de processos de oxidação/redução de outras espécies existentes na solução de trabalho (impurezas existentes no electrólito de suporte, solvente, componentes da amostra, gases dissolvidos). As correntes não-faradaicas podem ser minimizadas pelo uso de eléctrodos de pequena área superficial e pelo uso de um modo de aquisição de sinal (corrente) mais apropriado. Muito embora nenhum eléctrodo seja idealmente polarizado (transferência de carga na interface eléctrodo-electrólito de suporte nula em todo o intervalo de potencial), existem electrólitos de suporte que proporcionam um comportamento polarizado para alguns eléctrodos num intervalo limitado de potencial (janela de potencial de trabalho) [Wang, 1988]. A selectividade do eléctrodo em condições experimentais muito específicas também pode evitar que a corrente faradaica proveniente de substâncias potencialmente interferentes se manifeste.

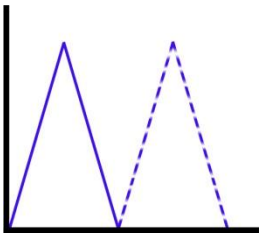
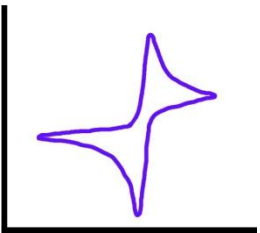
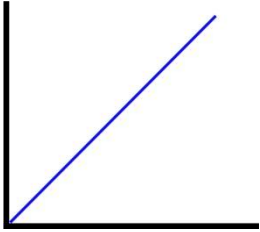
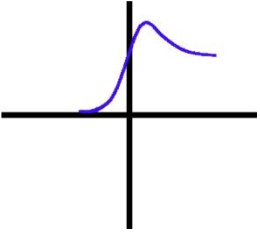
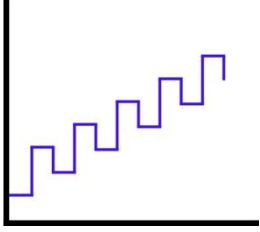
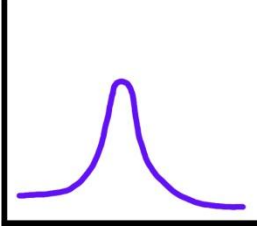
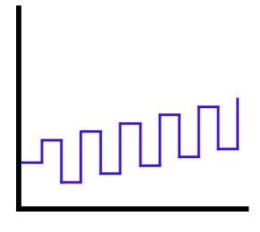
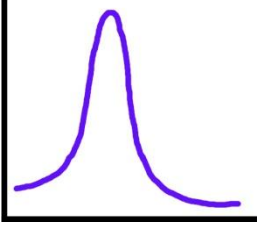
Entretanto, a utilização de um fluxo de azoto dentro da célula electroanalítica permite também um desarejamento da amostra, retirando o oxigénio do seio da mesma e, conseqüentemente, impedindo as possíveis reacções

deste na superfície do eléctrodo, em particular a sua redução electroquímica ou a sua acção oxidante sobre o sistema (eléctrodo ou espécies químicas).

O potencial aplicado no eléctrodo de trabalho actua como uma força motriz para a reacção electroquímica. É o potencial controlado que possibilita a espécie presente na solução ser oxidada ou reduzida na superfície do eléctrodo. À medida que o potencial se torna mais negativo, o eléctrodo torna-se numa fonte de electrões, favorecendo a redução das espécies na interface solução-eléctrodo. No caso de um potencial mais positivo é favorecida a oxidação das espécies pois o eléctrodo torna-se num aceitador de electrões. Desta forma, quando se faz um varrimento de potencial no sentido negativo, utiliza-se a denominação de varrimento catódico enquanto que quando se faz um varrimento de potencial no sentido positivo se denomina de varrimento anódico. A corrente eléctrica surge quando o potencial aplicado atinge um valor tal que permite que ocorra a reacção de oxidação/redução do analito. Se essa intensidade de corrente for proporcional à quantidade de espécies que reagem então pode-se utilizar este fenómeno do ponto de vista analítico-quantitativo.

A forma como o potencial é aplicado vai condicionar a forma como o sinal analítico é adquirido e irá denominar o tipo de técnica voltamétrica utilizada. As formas mais comuns de aplicação do potencial estão representadas na Tabela II. 1, bem como a forma de resposta da corrente resultante segundo revisão de Barek e seus colaboradores [Barek et al., 2001]. O modo de aquisição do sinal tem repercussão na sensibilidade do método, principalmente devido à magnitude da corrente capacitiva observada para cada caso e também à selectividade, devida ao formato do voltamograma e à largura dos pulsos de resposta medidos. Além do modo de aquisição, os métodos voltamétricos variam de acordo com as etapas utilizadas antes ou durante a medição do sinal, tais como a pré-concentração do analito (proveniente da capacidade do analito em reagir ou adsorver com o material do eléctrodo de trabalho) ou direcção ou inversão da direcção de varrimento de potencial. A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa/qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interacção entre o analito e o eléctrodo de trabalho [Pacheco, 2004]. Mais detalhes sobre os diferentes modos de aquisição são descritos a seguir.

Tabela II. 1 - Forma de aplicação do potencial para cada tipo de voltametria.

Tipo de Voltametria	Sinal de excitação (E vs t)	Corrente resultante (I vs E)
Voltametria cíclica		
Voltametria de varrimento linear		
Voltametria de impulso diferencial		
Voltametria de onda quadrada		

### II.1.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações qualitativas acerca de um dado sistema electroquímico. Entre esta informação inclui-se a identificação e caracterização de espécies electroactivas, estudo e diagnóstico de mecanismos de reacções electroquímicas e químicas, análise semi-quantitativa da cinética das reacções entre outras. A eficiência desta técnica resulta da habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos de oxidação/redução, da cinética de reacções heterogêneas de transferência de electrões e sobre reacções químicas, acopladas

ou não a processos adsorptivos [Wang, 2006]. Efectivamente, quando se estuda um novo sistema, recorre-se muitas vezes a esta técnica antes de qualquer outra, pois permite obter uma grande quantidade de informação num tempo relativamente curto. É uma óptima técnica para efectuar um estudo preliminar de um sistema electroquímico desconhecido.

Na voltametria cíclica, o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho varia entre dois valores, de uma forma cíclica, isto é, nos dois sentidos, a uma velocidade constante. O potencial varia linearmente ou em pequenos degraus, desde o valor inicial ( $E_i$ ), onde nenhuma oxidação ou redução ocorre, até a um valor onde o potencial é invertido, o potencial de inversão ( $E_{inv}$ ). A voltametria termina a um valor de potencial que pode ou não ser idêntico ao valor do  $E_i$ . Durante esta variação de potencial podem ou não ocorrer, na superfície do eléctrodo de trabalho, reacções de oxidação/redução das espécies electroactivas, adsorção de espécies ou outros fenómenos de superfície. Naturalmente que, se nenhuma reacção de oxidação/redução ocorrer, não se observará qualquer variação significativa na intensidade de corrente medida junto do eléctrodo de trabalho.

No estudo de reacções de oxidação/redução, os dados experimentais mais importantes a ter em conta na CV são os potenciais de pico anódico e catódico ( $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$ ) e a intensidade de corrente dos respectivos picos ( $i_{pa}$ ,  $i_{pc}$ ). A condição mais importante é a velocidade de varrimento ( $v$ ).

O efeito da variação da velocidade de varrimento, no perfil do voltamograma, é comumente estudado para se obter parâmetros cinéticos e de reversibilidade do sistema electroquímico, determinar o(s) processo(s) de superfície ou não, que controla(m) a transferência electrónica e identificar e estudar reacções químicas homogéneas acopladas.

Considere-se uma solução com uma espécie electroactiva **R**, susceptível de ser oxidada reversivelmente num dado eléctrodo, de acordo com a equação  $R \rightleftharpoons O + ne^-$  (Figura II. 1). Iniciando o varrimento de potencial a um valor em que não ocorrem reacções faradaicas, a corrente medida será mínima. Quando o potencial do eléctrodo de trabalho começa a variar no sentido de

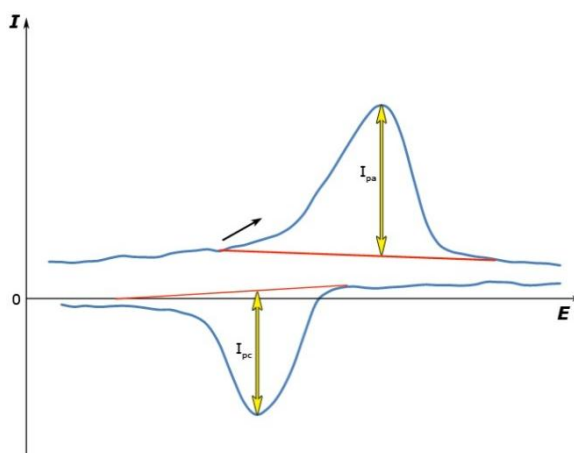
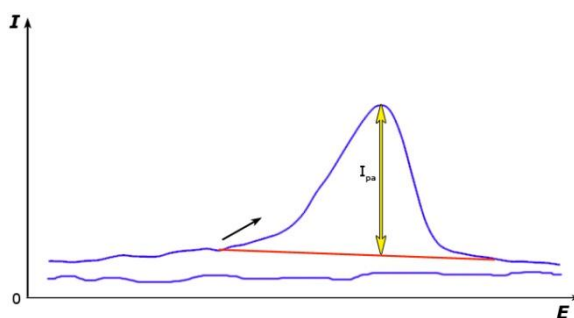


Figura II. 1 – Voltamograma típico para um processo reversível  $R \rightleftharpoons O + ne^-$ .

potenciais mais positivos, criam-se condições para que este se aproxime e ultrapasse o valor do potencial formal,  $E_f^\circ$ , do par **O/R**. Inicialmente a reacção de oxidação dar-se-á a uma velocidade pequena, aumentando progressivamente à medida que o potencial aumenta. Neste intervalo de tempo cria-se um gradiente de concentração das espécies **R**, desde o seio da solução até à superfície do eléctrodo, que obriga a espécie **R** a difundir-se para junto do eléctrodo. A difusão de mais espécies **R** para junto do eléctrodo e a cinética de transferência electrónica favorável (do sistema reversível considerado) determinam o aumento da corrente anódica até atingir o valor máximo. A partir deste instante e devido ao consumo continuado de espécies electroactivas **R** na camada de difusão, junto ao eléctrodo, esta aumenta de espessura diminuindo o gradiente de concentração e o fluxo destas espécies. Em consequência, a intensidade de corrente diminui, seguindo um perfil proporcional ao inverso da raiz quadrada do tempo,  $1/t^{1/2}$ . Depois de ultrapassar esta região de potencial, o sentido do varrimento inverte-se a um dado valor de potencial,  $E_{Inv}$ . No início desta inversão de potencial a oxidação continua a progredir a uma taxa muito reduzida mas, à medida que o potencial do eléctrodo de trabalho assume valores menos positivos e próximos de  $E_f^\circ$ , as espécies **O** formadas até então começam a ser reduzidas. De um modo análogo ao que acontece no varrimento anódico, neste varrimento de potencial no sentido de valores menos positivos resulta um pico de corrente, o pico catódico, que está associado à redução das espécies **O**.

Com o aumento da velocidade de varrimento de potencial, o tempo para atingir o equilíbrio na superfície do eléctrodo é menor, pelo que as reacções que aparecem como reversíveis, isto é, controladas pela difusão e/ou adsorção, com cinética de transferência electrónica elevada, para velocidades de varrimento menores, podem ser quase irreversíveis para velocidades elevadas. Este é um procedimento comum, utilizado para caracterizar a reversibilidade de sistemas electroquímicos.

No caso de uma reacção irreversível do tipo  $R \rightarrow O + ne^-$ , a voltametria cíclica conduz ao perfil voltamétrico descrito na Figura II. 2, no qual não aparece nenhum pico, após se inverter o sentido do varrimento [Brett & Oliveira-Brett, 1993; Pacheco, 2004; Wang, 2006].



**Figura II. 2 – Voltamograma típico para um processo irreversível  $R \rightarrow O + ne^-$ .**



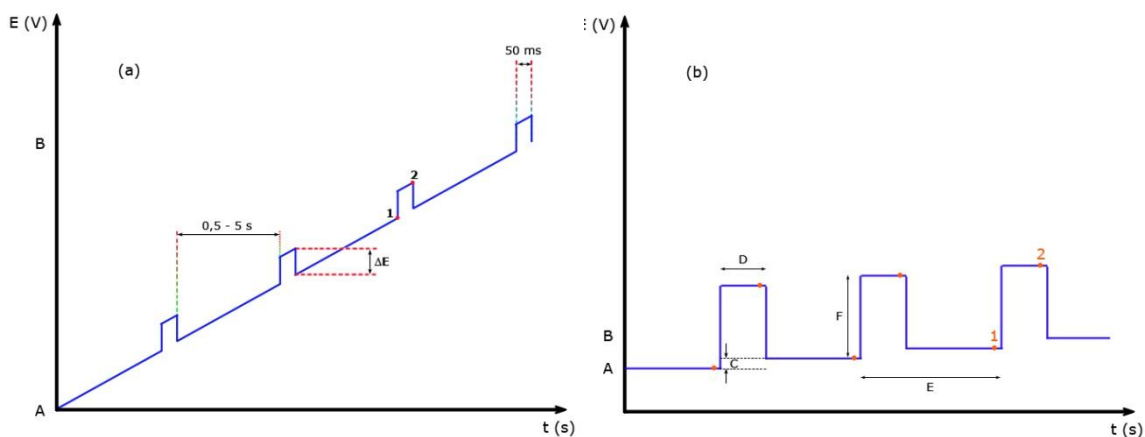
### II.1.2. Voltametria de varrimento linear

A voltametria de varrimento linear (LSV) é uma técnica simplificada da voltametria cíclica. Na LSV o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho varia linearmente (ou em pequenos degraus) com o tempo, mas apenas num único sentido (anódico ou catódico). Exceptuando alguns casos, não é uma técnica muito sensível. A corrente é lida de forma directa, em função do potencial aplicado. Desta forma a corrente total lida possui contribuições tanto da corrente faradaica (desejável) quanto da corrente capacitiva (ruído), que pode prejudicar em muito a utilização desta técnica em aplicações quantitativas. Os limites de detecção obtidos por esta técnica, nas estimativas mais optimistas, são da ordem de  $10^{-6}$  mol.dm<sup>-3</sup>, quando não se consideram os eléctrodos quimicamente modificados [Pacheco, 2004]. Neste último caso os limites de detecção podem diminuir em 1000 vezes.

Os parâmetros a ter em conta nesta técnica são o potencial inicial,  $E_i$ , o potencial final,  $E_f$ , e a velocidade de varrimento,  $v$ . O potencial aplicado em cada instante é função da velocidade de varrimento e do tempo,  $t$ , e pode ser descrito pela seguinte expressão:  $E(t) = E_i \pm v \cdot t$  (sinal + quando o varrimento é realizado no sentido de potenciais mais positivos e sinal – quando o varrimento é realizado no sentido de potenciais mais negativos) [Gao & Roy, 1994; Wang, 2006].

### II.1.3. Voltametria de impulso diferencial

A voltametria de impulso diferencial (DPV), tal como a voltametria de onda quadrada, é uma técnica muito útil na medição de concentrações vestigiais de espécies orgânicas e inorgânicas. Nesta técnica são aplicados ao eléctrodo de trabalho impulsos de amplitude fixa sobrepostos a uma rampa (Figura II. 3-a) ou a uma escada (Figura II. 3-b) de potencial crescente, que variam, respectivamente, de uma forma linear ou regular com o tempo. O primeiro esquema utiliza-se normalmente em instrumentos analógicos enquanto o segundo se utiliza preferencialmente em instrumentos digitais. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do impulso e no final do impulso. O potenciostato mede a diferença de intensidade de corrente,  $\Delta I = I_2 - I_1$ , em cada impulso, em função do potencial aplicado. Sendo a DPV uma técnica diferencial, a resposta é semelhante à primeira derivada de um voltamograma de impulso normal, isto é, um pico em que a altura deve ser directamente proporcional à concentração do analito em estudo [Pacheco, 2004; Wang, 2006]. Uma vantagem desta técnica é ser possível observar



**Figura II. 3 – Perfil de aplicação de potenciais em voltametria de impulso diferencial: impulsos sobre (a) rampa e (b) escada. 1 e 2 – Instantes em que se faz a medição da intensidade de corrente  $I_1$  e  $I_2$ , respectivamente; A – potencial inicial ( $E_i$ ); B – potencial final ( $E_f$ ); C – incremento de potencial entre dois impulsos consecutivos (equivalente ao valor do degrau de potencial,  $\Delta E_s$ ); D – duração do(s) impulso(s) (equivalente ao período de modulação,  $t_p$ ); E – intervalo de tempo entre a aplicação de dois impulsos consecutivos (equivalente à duração do degrau de potencial,  $t_s$ ); F – amplitude do(s) impulso(s),  $\Delta E_p$ .**

máximos de picos individuais de espécies electroactivas que têm potenciais de semi-onda que diferem em apenas 0,04-0,05 V enquanto a voltametria clássica ou a de impulso normal requiere uma diferença de potenciais de aproximadamente 0,2 V para que os dois picos não se sobreponham. Por outro lado, a voltametria de impulso diferencial permite aumentar bastante a sensibilidade dos métodos voltamétricos. Esta elevada sensibilidade pode atribuir-se ao aumento significativo da intensidade faradaica e à diminuição na intensidade de carga não faradaica. No que diz respeito ao primeiro factor, há que considerar os acontecimentos que têm lugar junto do eléctrodo de trabalho quando se aumenta repentinamente o potencial. Se uma espécie reactiva estiver perto do eléctrodo, produzir-se-á um aumento de intensidade de corrente que fará diminuir a concentração no analito na proporção exigida pelo novo potencial. Quando se alcança a concentração de equilíbrio para este potencial, a intensidade cai para um nível suficiente para neutralizar a difusão. Na DPV, as medições de intensidade de corrente fazem-se antes que o aumento de potencial tenha terminado completamente [Skoog et al., 2007].

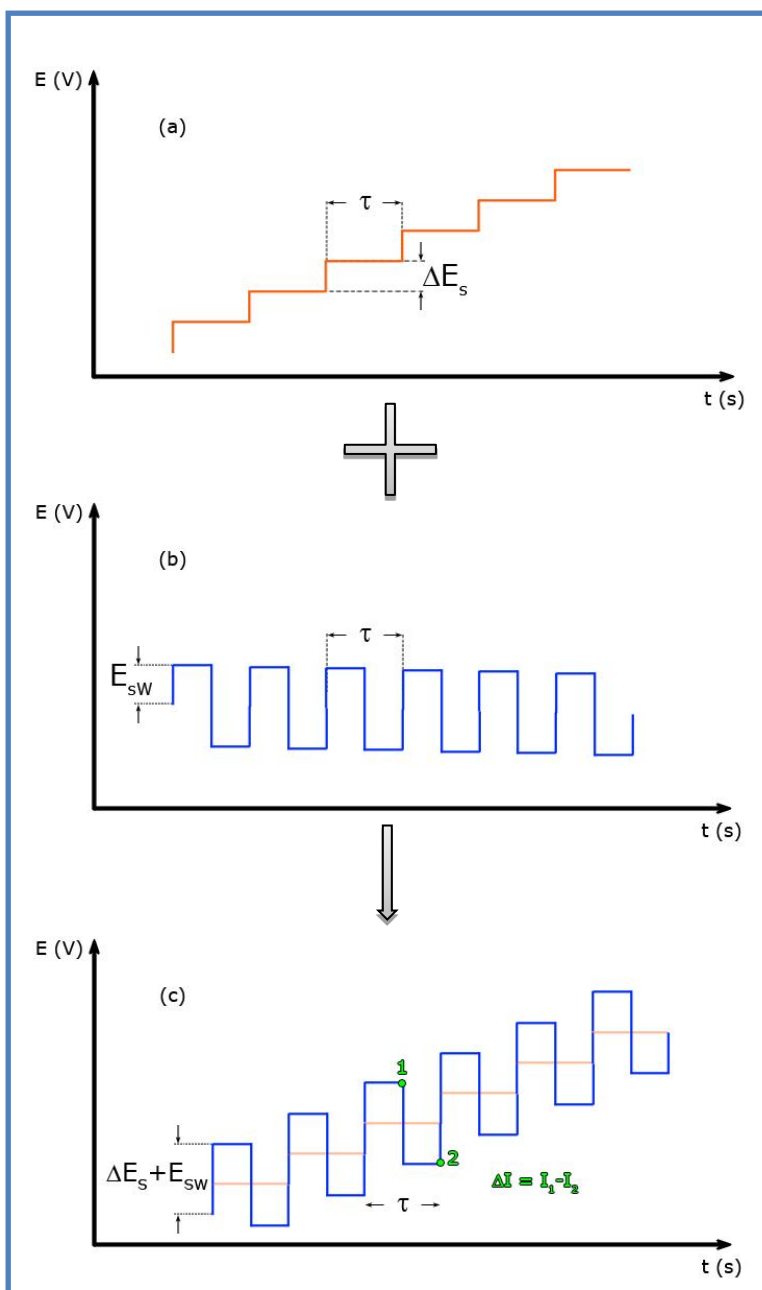
#### II.1.4. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é também uma voltametria por impulso de potencial, que oferece a vantagem de possibilitar uma elevada velocidade de análise associada a uma também elevada sensibilidade. A SWV

permite obter voltamogramas em poucos segundos. Esta técnica começou por ser utilizada sobretudo com o eléctrodo de mercúrio de gota gotejante [Skoog et al., 2007]. No entanto, a sua utilização estendeu-se a outros eléctrodos como, por exemplo, o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa utilizado no presente trabalho.

Esta técnica, desenvolvida em 1952 por Baker e aperfeiçoada mais tarde por Ramalay e Krause (1969) e Osteryoung *et al.* (1977), foi inicialmente pouco utilizada devido às inúmeras dificuldades electrónicas existentes na altura e que foram ultrapassadas graças aos inúmeros progressos na instrumentação, sendo hoje em dia muito utilizada em Química Analítica.

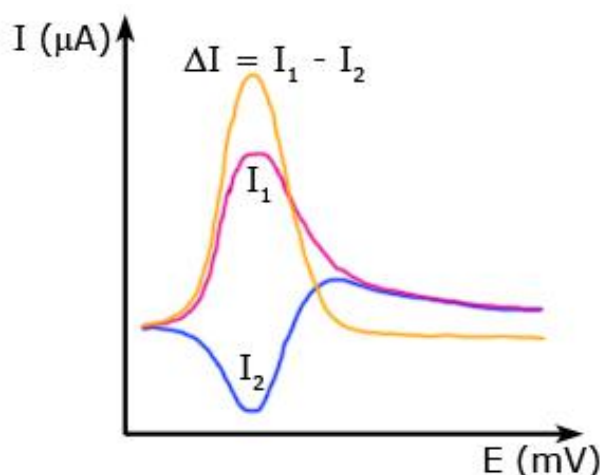
Caracteriza-se pela aplicação de um varrimento de potencial com impulsos periódicos, alternados em torno de um valor médio, que varia temporalmente [Souza et al., 2003]. O perfil de potencial da SWV combina uma escada de potencial, com degraus de pequena amplitude  $\Delta E_s$  (da ordem de grandeza das unidades/dezenas de mV) e duração  $t_s$ , com uma onda quadrada de amplitude elevada  $\Delta E_{sw}$  (da ordem de grandeza das dezenas/centenas de mV) e período  $\tau$  (da ordem de grandeza das centenas/décimas de ms) ou frequência  $f=1/\tau$  (10 a 2000 Hz), de tal



**Figura II. 4 – Sinal de excitação para a SWV.** O sinal em escada (a) soma-se a um conjunto de impulsos (b) para se obter um sinal de excitação de onda quadrada (c). A resposta de intensidade  $\Delta I$  é igual à diferença de intensidades medidas nos potenciais 1 e 2. A amplitude dos degraus, nesta figura, aparece exagerada para melhor percepção.

modo que  $t_s = \tau$  (Figura II. 4) [Wang, 2006; Skoog et al., 2007].

No decorrer deste varrimento de potencial, os valores de intensidade de corrente são lidos imediatamente antes do final dos impulsos, seja ele directo ou inverso. Na Figura II. 4 (c) encontram-se marcados os pontos 1 e 2 que correspondem aos instantes onde será efectuada esta leitura. A intensidade de corrente total medida,  $\Delta I$ , corresponde à diferença entre a intensidade medida no ponto 1,  $I_1$ , e a intensidade medida no ponto 2,  $I_2$  [Skoog et al., 2007]. Para um sistema oxidação/redução que apresenta alguma reversibilidade electroquímica e em que tanto a redução como a oxidação ocorrem com facilidade numa dada região de potencial,  $I_1$  e  $I_2$  aumentam mas com sinais contrários. Em consequência, forma-se um pico no voltamograma em que  $\Delta I = I_1 - I_2$  é maior que qualquer uma das componentes separadas (Figura II. 5).



**Figura II. 5 – Representação esquemática das intensidades de corrente directa ( $I_1$ ) e inversa ( $I_2$ ) e a intensidade diferencial.**

No caso de um sistema totalmente irreversível, como uma das componentes é nula, o valor de  $\Delta I$  correspondente ao pico do voltamograma será igual à componente de intensidade de corrente não nula. A observação dos picos de corrente total, directa e inversa, as suas posições relativas no eixo de potencial e a análise dos respectivos valores de  $\Delta I$ ,  $I_1$  e  $I_2$  ajudam a perceber a natureza da reacção electroquímica. Em electroanálise espera-se a obtenção de um pico cuja altura seja proporcional à concentração do analito electroactivo no seio da solução de modo a permitir a quantificação do mesmo.

Devido à forma rápida e diferencial como a intensidade de corrente é medida, a SWV encerra uma série de vantagens em relação a outras técnicas voltamétricas. Esta técnica consegue, na medição da intensidade de corrente,

discriminar eficazmente a corrente não faradaica (um somatório da corrente capacitiva e residual, também designado por ruído electroquímico). No processo subtractivo das correntes directa e inversa, na maioria dos casos, só a corrente de fundo é eliminada. Neste caso podem realizar-se medições voltamétricas com uma velocidade muito maior, sem que a corrente de fundo afecte a medição da corrente faradaica. Devido à rapidez das medições e cinética de transferência electrónica reduzida de interferentes importantes, como o oxigénio dissolvido, e a potenciais catódicos, é possível com a SWV realizar medições em sistemas de onde o oxigénio não possa ser removido (por exemplo sistemas aeróbios).

Por outro lado, mesmo que a concentração de espécies electroactivas seja muito baixa e as intensidades de corrente directa e inversa sejam diminutas, a subtracção de valores com sinal contrário pode traduzir-se, ainda assim, num sinal suficientemente mensurável. Isto significa que a SWV conjuga uma sensibilidade muito elevada com uma gama de concentrações que se estende a valores vestigiais.

A versatilidade desta técnica faz com que ela seja muito utilizada quer em estudos analíticos quer em estudos mecanísticos [Rodrigues, 2002].

### **II.1.5. Voltametria de redissolução anódica de onda quadrada**

Esta voltametria é uma versão mais elaborada da voltametria de onda quadrada, em que existem duas etapas prévias antes do varrimento voltamétrico propriamente dito. Nestas duas etapas o analito é pré-concentrado catodicamente no eléctrodo de trabalho (i.e., o analito é reduzido electroquimicamente no eléctrodo) e depois, na etapa da medição voltamétrica o analito é reoxidado à sua forma original, à medida que o eléctrodo é polarizado anodicamente. A primeira das duas etapas denomina-se etapa de deposição. É realizada a um potencial suficientemente catódico, em relação ao potencial formal do par oxidação/redução em estudo, pode ter uma duração variável de alguns minutos ou até ser suprimida e envolve a convecção forçada e controlada da solução, de modo a favorecer a pré-concentração do analito na forma mais reduzida. A segunda etapa, denominada de etapa de equilíbrio, deve realizar-se a um potencial idêntico ao potencial de deposição e ao potencial inicial, com uma duração até uns 30 s, mas em condições em que a convecção deve ser suprimida. Nesta etapa haverá também pré-concentração do analito, mas em condições menos favoráveis que na etapa



anterior, devido à reduzida convecção. Em qualquer dos casos, o valor de potencial seleccionado para as duas etapas e a duração das mesmas poderão determinar fortemente a quantidade de analito pré-concentrado.

A contribuição mais significativa desta voltametria é o facto de o sinal analítico ser consideravelmente amplificado, devido à acumulação de uma quantidade representativa do analito num volume (filme adjacente à superfície do eléctrodo ou no interior deste) muito mais pequeno que o volume de solução em estudo. Como esta situação se traduz num aumento de concentração do analito junto da interface polarizada do eléctrodo, a taxa a que a carga eléctrica (coulomb/segundo = ampère) é transferida num processo redox aumenta.

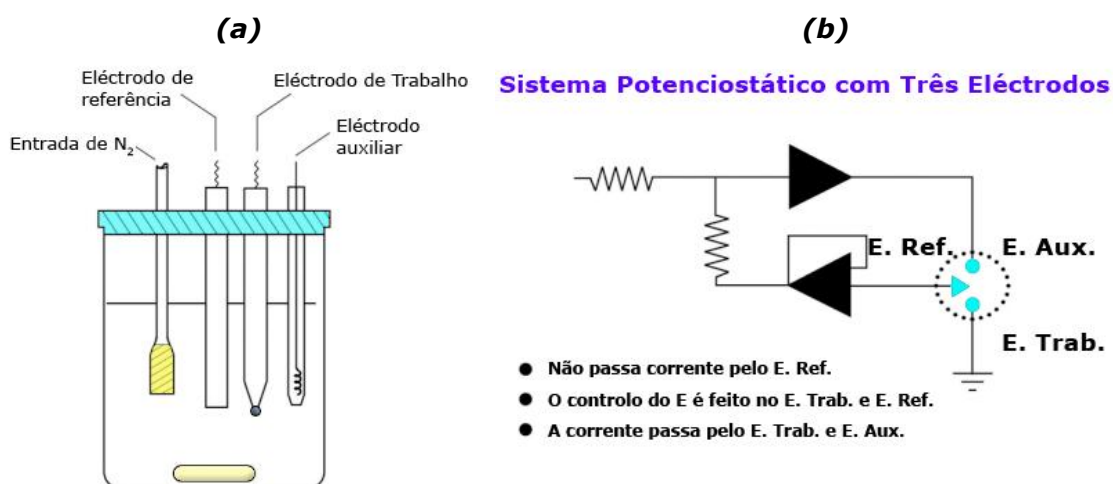
### II.1.6. Célula voltamétrica

Uma célula electroquímica típica é constituída por pelo menos dois condutores, denominados de eléctrodos, ambos imersos numa solução adequada de electrólito de suporte. Para que circule corrente na célula é necessário que: (1) os eléctrodos estejam ligados externamente mediante um condutor metálico; (2) que as duas soluções de electrólito de suporte (caso sejam duas) estejam também em contacto, através de uma ponte salina, para permitir o movimento dos iões de um eléctrodo para o outro de modo a compensar as cargas. Por vezes é possível preparar células em que ambos os eléctrodos têm um electrólito de suporte comum, eliminando-se desta forma o efeito dos potenciais de junção líquida que se geram entre os contactos dos electrólitos de suporte com a ponte salina [Skoog et al., 2007].

As células electroquímicas utilizadas em voltametria/polarografia são do tipo electrolítico e podem ter dois ou três eléctrodos. Na célula com dois eléctrodos tem-se um eléctrodo de trabalho de superfície pequena, isto é, um microeléctrodo. No caso da polarografia clássica o eléctrodo de trabalho é um eléctrodo gotejante de mercúrio. Nas voltametrias, em geral, utilizam-se actualmente outros tipos de eléctrodos de trabalho, em que se incluem outros eléctrodos de mercúrio (e.g. gota suspensa ou filme) e eléctrodos sólidos. O potencial é aplicado no eléctrodo de trabalho frente a um eléctrodo de referência, usualmente o eléctrodo de calomelano ou o eléctrodo de prata/cloreto de prata, de área superficial grande, para que apenas o eléctrodo de trabalho polarize. Esta célula apresenta alguns inconvenientes pois a corrente resulta do varrimento de potencial que passa através do eléctrodo de referência. Isto faz com que se tenha de utilizar um

eléctrodo de calomelano ou de prata/cloreto de prata com um reservatório grande de KCl, devido à reacção que ocorrerá no mesmo. Outra limitação é a resistência da célula. Quando esta aumenta, como é o caso de meios não aquosos, diminuirá a corrente que passa através dos eléctrodos, o que provocará distorções nos polarogramas, tornando inviável a utilização da técnica nestas condições. Para resolver estas limitações das células de dois eléctrodos foi desenvolvida a célula de três eléctrodos (Figura II. 6 **(a)**). O terceiro eléctrodo é chamado de eléctrodo auxiliar, e pode ser de platina, ouro, carbono vítreo, prata, entre outros.

Nestas células os eléctrodos são ligados a um amplificador operacional, pertencente ao circuito electrónico do potenciostato. O amplificador operacional vai actuar quando for aplicada uma diferença de potencial entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência, fazendo com que a resistência do eléctrodo de referência aumente e a do eléctrodo auxiliar diminua (Figura II. 6 **(b)**). Desta forma a corrente passará entre o eléctrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como electrólise, por exemplo) no eléctrodo de referência. Fazendo uso desta ferramenta o eléctrodo de referência realizará o seu papel sem interferências, isto é, mantendo o potencial constante durante as medições. Então, pode-se utilizar, além do eléctrodo de trabalho e do auxiliar, um eléctrodo de referência de dimensões reduzidas o que facilita o uso de recipientes de tamanho reduzido.



**Figura II. 6 – Célula polarográfica/voltamétrica de três eléctrodos. (a) Representação esquemática mostrando os eléctrodos no recipiente voltamétrico; (b) Esquema mostrando o sistema potenciostático.**

De um modo geral, a célula de três eléctrodos apresenta as seguintes vantagens:

1. É mais adequada para soluções diluídas;
2. Pode ser usada para soluções de alta resistência (solventes orgânicos, mistura de água mais solvente orgânico);
3. Pode ser usada com electrólitos de suporte mais diluídos.

### II.1.7. Eléctrodos de trabalho

Em voltametria, um dos eléctrodos de trabalho mais utilizados e que apresenta mais vantagens, no que concerne à determinação e quantificação de inúmeras espécies é o eléctrodo de mercúrio [Aleixo, 2003]. Este eléctrodo apresenta uma superfície muito pequena, podendo ser controlada pelo operador, nalguns aparelhos, a área superficial do eléctrodo. O eléctrodo não é mais do que uma pequena gota de mercúrio líquido, que pode ser usado no modo estático ou gotejante. Em alternativa pode-se utilizar um filme de mercúrio. No primeiro caso este eléctrodo é constituído por um reservatório de mercúrio que se encontra ligado a um tubo capilar de vidro com comprimento entre 5 a 20 cm. O mercúrio é forçado, quer pela força gravítica quer por pressão de um gás inerte, a passar através desse tubo com cerca de 0,02 mm a 0,05 mm de diâmetro interno. No caso de se utilizar o eléctrodo de mercúrio estático, na versão mais conhecida de eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), tal como o nome indicia, a gota de mercúrio, depois de formada, permanece imóvel na ponta do tubo capilar e o varrimento é efectuado com uma única gota, sendo o voltamograma registado sob estas condições. No caso do eléctrodo de mercúrio de gota gotejante, tal como o nome também indicia, durante um determinado varrimento apresenta um fluxo constante de gotas idênticas, cujos diâmetros podem variar entre 0,2 mm e 1 mm. Estas gotas vão-se formando em intervalos de tempo definidos pelo operador, que variam entre 1 a 5 segundos, devido à pressão exercida pelo mercúrio dentro do reservatório. No caso do eléctrodo de filme de mercúrio, o filme é depositado electroquimicamente em superfícies sólidas, como de platina ou de carbono vítreo, a partir da redução catódica de iões mercúrio (II) de uma solução. Estes eléctrodos de mercúrio são utilizados essencialmente na zona catódica, em potenciais que podem variar entre +0,3 V a -2,4 V vs o eléctrodo de calomelanos saturado (ECS). Estes eléctrodos apresentam-se como importantes pois a sua zona de actuação coincide com a região de potencial onde ocorrem as reacções electroquímicas da



maioria dos iões metálicos e de um grande número de espécies orgânicas. No modo gotejante e no modo estático este eléctrodo apresenta uma superfície renovável, evitando, entre outros, problemas devido aos chamados envenenamentos superficiais.

Entre os eléctrodos sólidos, o de platina é um dos mais populares. Actua na região de potencial de cerca de +1,1 V a -0,5 V vs ECS, dependendo do electrólito de suporte utilizado. É útil na região anódica, onde o eléctrodo de mercúrio não actua. Outro eléctrodo sólido útil na região anódica é o de ouro, que pode ser utilizado em intervalos de potencial de +1,5 V a -0,8 V vs ECS.

Muito usados na região anódica e também catódica são os eléctrodos de carbono, principalmente o de carbono vítreo, que actua no intervalo +1,5 V a -1,1 V vs ECS, dependendo do meio utilizado.

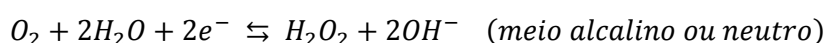
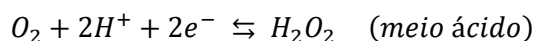
Existem também eléctrodos sólidos que podem ser usados na região catódica. No entanto nenhum deles apresenta um desempenho superior ao do eléctrodo de mercúrio, devido principalmente às suas propriedades no que concerne à renovação fácil e rápida da sua superfície e à formação de amálgamas com vários metais.

Mais recentemente têm sido desenvolvidos novos tipos de eléctrodos de trabalho para serem usados em voltametria, tais como os eléctrodos quimicamente modificados e os ultra-microeléctrodos. Actualmente reconhece-se o enorme potencial destes eléctrodos e, em vários casos, a capacidade comprovada de serem uma alternativa mais eficaz aos eléctrodos já existentes, transformando a voltametria numa técnica cada vez mais poderosa.

### II.1.8. Remoção do Oxigénio

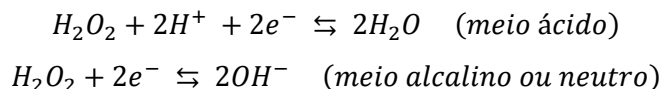
Grande parte das soluções apresenta dissolvido no seu seio oxigénio atmosférico. O oxigénio é electroactivo e produz ondas polarográficas na região catódica, mais concretamente uma com potencial de meia onda,  $E_{1/2}$ , ao redor de -0,05 V vs ECS e outra com  $E_{1/2}$  ao redor de -1,0 V vs ECS [Aleixo, 2003]. Desta forma, quando se trabalha na região catódica, há a necessidade da remoção do oxigénio atmosférico dissolvido.

A primeira onda catódica é devida às reacções:



Quer a formação do peróxido de hidrogénio na redução do oxigénio em meio ácido quer em meio alcalino ou neutro vai ocorrer aproximadamente no mesmo potencial ( $E_{1/2} \approx -0,05$  V vs ECS).

A segunda onda catódica ( $E_{1/2} \approx -1,0$  V vs ECS) é devida às seguintes reacções:



Como consequência, na região catódica, quando se faz uma medição voltamétrica ou polarográfica na presença de oxigénio, a corrente de fundo será alta e irá mascarar a corrente produzida pela espécie electroactiva. Desta forma, é necessário remover o oxigénio dissolvido na solução antes de se iniciar as medidas. Consegue-se isto desarejando a solução através da passagem de um gás inerte isento de oxigénio. O gás é borbulhado na solução durante alguns minutos, removendo o oxigénio e ficando dissolvido em vez deste. Como este gás é electroquimicamente inerte no intervalo de potencial de interesse não produzirá nenhuma corrente de fundo. Os gases mais utilizados para este fim são o azoto ( $N_2$ ), árgon (Ar), néon (Ne) e hélio (He). O azoto é um dos mais utilizados por ser mais barato e poder ser facilmente obtido com um elevado grau de pureza no que respeita à presença de oxigénio. Quando isto não se consegue podem ser utilizados frascos de purificação de gás, intercalados entre a botija de  $N_2$  e a célula electroquímica, contendo redutores que removerão o oxigénio, purificando assim o azoto que será borbulhado na solução contendo o nosso analito [Aleixo, 2003].

Além do oxigénio constituir uma interferência, devido à capacidade para ser electroquimicamente reduzido, deve considerar-se também o seu papel como agente oxidante. Assim, naqueles casos em que o oxigénio (ou um seu conjugado redox) pode actuar como oxidante do analito ou favorecer a oxidação do material do eléctrodo, será conveniente removê-lo da solução [Brett & Oliveira-Brett, 1993].

## Capítulo III

*"I was intrigued by neural networks that could automatically learn a pattern. I was very excited about finding these magical devices that, once you discovered the right design, you could turn on and they would get smarter."*

David Shaw, 1997

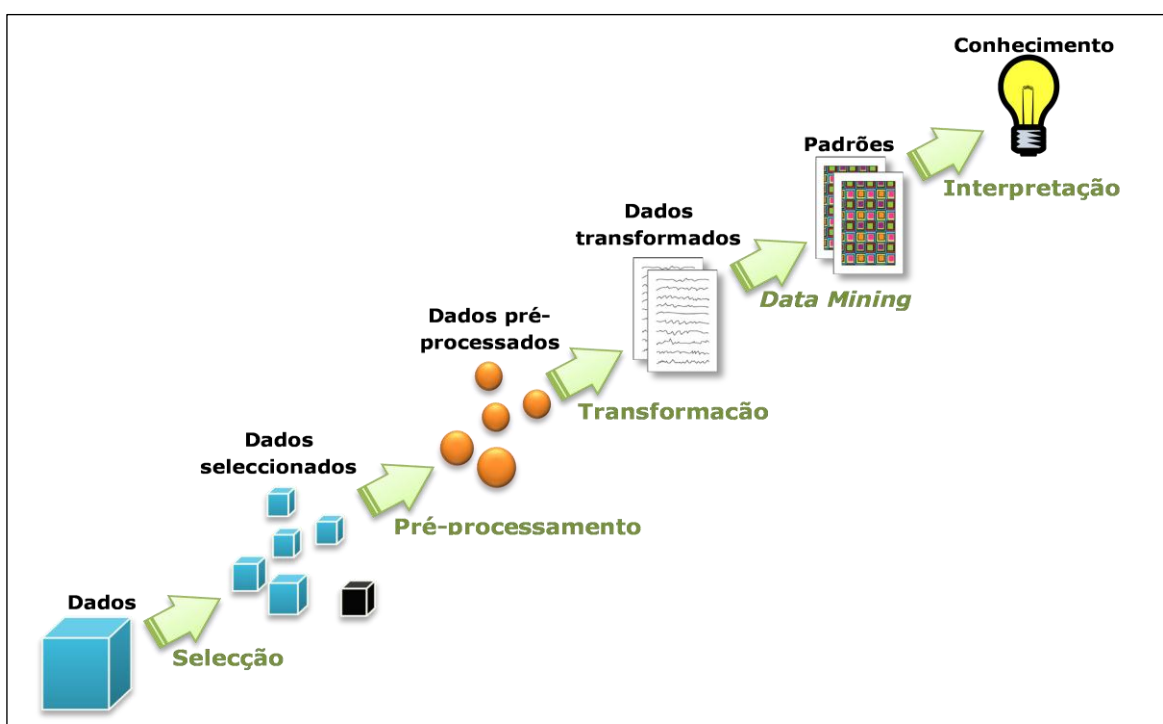
### **Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados**

O volume de dados que são criados, armazenados e manipulados pela maioria das organizações apresenta uma taxa de crescimento diária que ultrapassa a nossa capacidade de analisar, sintetizar e extrair conhecimento a partir desses dados. Apesar da existência de Sistemas Gestores de Bases de Dados (SGBD), que nos fornecem ferramentas capazes de armazenar e visualizar grandes quantidades de informação, a utilização de ferramentas específicas, desenhadas e implementadas com o objectivo de automatizar o processo de análise de dados, é cada vez mais importante e imprescindível [Santos et al., 1999].

Neste contexto, surgiu uma nova área de investigação denominada Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados (DCBD), que se desenvolve em várias fases e inclui a gestão dos algoritmos de *Data Mining*, utilizados para extrair padrões dos dados e interpretar esses mesmos padrões. As ferramentas de DCBD utilizam uma diversidade de algoritmos para identificar relações e padrões comuns, que estão escondidos entre o grande volume de dados disponíveis. Estas relações e padrões encontrados representam conhecimento implícito na Base de Dados (BD) explorada e nas entidades nela contidas. Uma outra fase do processo é decidir se as relações e padrões encontrados reflectem ou não conhecimento útil, fase a qual implica normalmente a participação do utilizador [Fayyad et al., 1996a]. O desenvolvimento desses algoritmos é um dos objectos de estudo da Inteligência Artificial (IA), uma disciplina relativamente recente, mas com um potencial de aplicação elevado nas mais diversas áreas do conhecimento.

### III.1. O processo de Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados

A Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados (DCBD) é definida como “o processo não trivial de identificação de padrões a partir dos dados, sendo os mesmos válidos, desconhecidos e potencialmente úteis”. O processo de DCBD (Figura III.1), que se desenvolve em várias etapas, inclui a utilização dos algoritmos de *Data Mining* e a interpretação dos padrões encontrados pelos mesmos, os quais poderão fundamentar o processo de tomada de decisão.



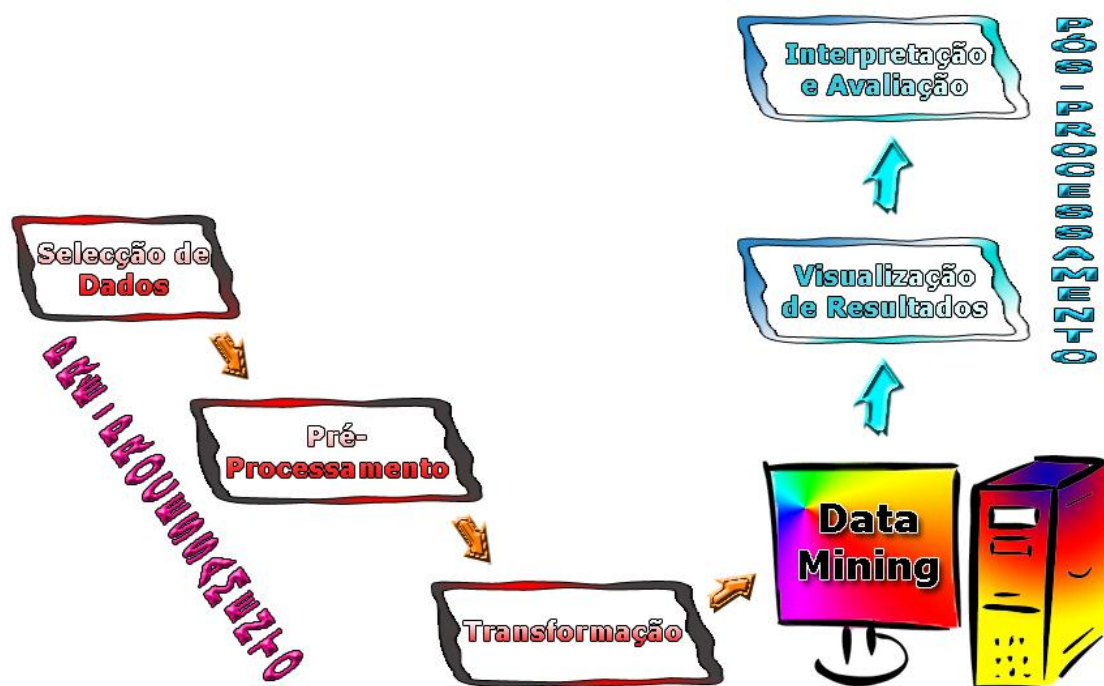
**Figura III.1 – O processo de Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados** (Adaptado de Fayyad et al, 1996a)

Consoante o autor, a área de especialização e a abordagem assim se podem considerar mais ou menos etapas. Contudo, as etapas apresentadas na Figura III.1 são comuns, e podem ser sintetizadas em:

1. **Seleccção** dos dados a tratar, que inclui a percepção do conhecimento relevante sobre o domínio e os objectivos a atingir no processo. Consiste no estudo/compreensão do domínio de aplicação e na selecção dos dados a analisar. Procura-se, deste modo, limitar o espaço de pesquisa, direccionando o foco para subconjuntos de variáveis ou dados, onde será realizada a descoberta de conhecimento;

2. **Pré-processamento** tendo em vista a limpeza dos dados. É frequente o aparecimento de dados inconsistentes, de valores omissos ou a presença de ruído, para os quais é necessário definir uma estratégia de actuação. Pode ainda ser constatada a existência de atributos redundantes ou a falta de atributos relevantes que conduzem à necessidade de integração de novos dados e/ou a reconfiguração dos dados para assegurar uma BD uniforme e consistente;
3. **Transformação dos dados**, o que inclui a procura de formatos apropriados para armazenar os dados. Esta etapa tem como objectivo facilitar a utilização dos dados por parte das ferramentas de Data Mining;
4. **Data Mining**, envolve a selecção e utilização dos métodos e técnicas que melhor se enquadrem no cumprimento das metas inicialmente estabelecidas. Depende, fundamentalmente, dos objectivos do processo de Data Mining;
5. **Interpretação** dos padrões encontrados. Nesta fase inclui-se a visualização dos padrões encontrados, a remoção de padrões irrelevantes ou redundantes. Na verdade, procura-se construir uma representação do conhecimento acessível e clara. Os padrões identificados pelo sistema são interpretados como conhecimento, o qual pode ser usado como suporte à tomada de decisão. Este conhecimento traduz-se, por exemplo, no entendimento dos conteúdos da BD ou na explicação de um fenómeno observado.

As etapas do processo de DCBD apresentadas na Figura III.1 podem ser agrupadas em três tarefas distintas: o pré-processamento, o Data Mining e o pós-processamento (Figura III.2). O pré-processamento está relacionado com a adequação dos dados, de acordo com as técnicas de Data Mining a utilizar. A segunda tarefa, designada por Data Mining, é o núcleo de todo o processo, sendo muitas vezes confundida com ele. A terceira tarefa é composta pela visualização, a interpretação e a avaliação dos resultados.



**Figura III.2 – Fases de desenvolvimento do processo de descoberta de conhecimento em bases de dados agrupadas em tarefas.**

Todo este processo é iterativo e interativo possibilitando retrocessos nas diversas fases e a participação do utilizador sempre que se justifique a tomada de decisão. Em termos de “trabalho”, a fase de *Data Mining* representa normalmente 20% do tempo gasto em todo o processo. Esta é também a fase que é melhor suportada automaticamente (por *software*). Todas as outras fases, desde a selecção dos dados até à interpretação dos padrões encontrados, constituem mais uma questão de “arte” do que uma rotina que possa ser automatizada [Andrienko & Andrienko, 1998].

### III.2. *Data Mining*

Encontram-se várias definições para o termo *Data Mining*, consoante a área de especialização, o autor e a abordagem (Bramer, 2007; Chang et al., 2001; Cios et al., 2007; Fayyad, 1997; Fayyad et al., 1996; Taniar, 2008). Contudo, existem características comuns que se podem sintetizar na seguinte definição: aplicação de métodos e técnicas em grandes Bases de Dados para encontrar tendências ou padrões com o intuito de descobrir conhecimento.

Como foi anteriormente referido, a etapa de Data Mining é apenas uma fase do processo de Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados. Consiste na escolha e utilização dos métodos e técnicas que melhor se enquadram no cumprimento dos objectivos estabelecidos. De um modo geral, os objectivos de Data Mining podem ser divididos em duas tarefas/objectivos gerais (previsão e descrição). No caso da previsão pretende-se inferir comportamentos futuros com base nas experiências do passado, ao passo que na descrição pretende-se descrever de forma compacta conjuntos de dados ou associações variáveis.

As tarefas referidas anteriormente são, normalmente, divididas em subtarefas. Assim, no que concerne à previsão, esta pode ser dividida em:

1. **Classificação** – corresponde à descoberta de uma função que associa um caso a uma das diversas classes discretas de classificação, de forma a classificar um novo objecto de acordo com um padrão de classificação; e

2. **Regressão** – consiste em prever valores futuros ou desconhecidos de uma variável dependente, a partir de exemplos. Corresponde à concepção de um modelo capaz de aprender uma função desconhecida que se aproxime da função dada por um conjunto de características genéricas.

Relativamente ao objectivo descrição é comum dividir-se em:

1. **Associação ou dependência** – consiste em encontrar um modelo que descreva dependências significativas entre variáveis, através da identificação de grupos de dados fortemente correlacionados. As associações surgem quando várias ocorrências estão ligadas num único evento podendo surgir a nível estrutural ou quantitativo;

2. **Sumariação** – corresponde a encontrar uma descrição compacta para subconjuntos de dados através de regras de resumo e de descobertas de relações entre as variáveis;

3. **Segmentação** – permite identificar um conjunto finito de categorias ou segmentos para descrever os dados. Os objectos pertencentes ao mesmo segmento são semelhantes entre si e diferentes dos objectos pertencentes a outros segmentos. Pode ser um objectivo intermédio de Data Mining, sendo realizado numa fase inicial, para encontrar grupos homogéneos de dados para posterior aplicação de algoritmos de aprendizagem; e

4. **Visualização** – trata da apresentação dos resultados de Data Mining através de uma forma visual com o recurso a gráficos ou diagramas. Pretende dar a conhecer informações complexas de uma forma acessível, evidenciando os padrões e as tendências reveladas.

### III.3. Modelos e Técnicas de *Data Mining*

Um modelo é definido como uma função que atribui a cada exemplo possível, no domínio definido pelos atributos de entrada, um valor contido no domínio do atributo de saída, contendo cada modelo um conjunto de parâmetros que têm de ser ajustados (ou estimados), a partir de um conjunto de dados, através de um algoritmo, na fase de aprendizagem. Após a aprendizagem, é possível extrapolar novas saídas, alimentando o modelo com novas entradas [Cortez, 2004]. Como técnica compreende-se o conjunto de processos baseados em conhecimentos científicos, de cálculo ou experimentação, utilizados para a obtenção de resultados.

Quando se pretende construir um modelo há que definir as principais características do sistema, que devem representar o objecto de estudo o mais fielmente possível, recolher todos os dados necessários à sua construção e consequente validação, sendo por isso necessária uma divisão dos dados em, pelo menos, dois subconjuntos. Um desses subconjuntos é utilizado para gerar o modelo, sendo designado por conjunto de treino. O(s) outro(s) são utilizados para testar e para validar o modelo, sendo designados, respectivamente, por conjunto de teste e conjunto de validação. Em geral, o conjunto de treino tem um número de dados superior aos dos outros conjuntos. As proporções relativas destes subconjuntos são variáveis e dependem de vários factores, nomeadamente natureza do problema, número de casos da amostra e técnica a utilizar [Teixeira, 2005].

Existem vários modelos de *Data Mining* mas nenhum deles apresenta universalidade na sua aplicação, isto é, nenhum deles resolve eficientemente todos os problemas [Harrison, 1998]. Na verdade, a escolha de um determinado algoritmo para um dado problema não é um processo linear. É possível utilizar diferentes modelos para a mesma tarefa com vantagens e desvantagens intrínsecas [Fayyad et al., 1996b]. A Tabela III.1 associa as diversas tarefas e as técnicas de *Data Mining* utilizadas com maior frequência [Teixeira, 2005].



Tabela III.1 – Aplicação dos modelos de *Data Mining* a diversas tarefas.

<b>Tarefas</b>  <b>Modelos de Data Mining</b>	<b>Classificação</b>	<b>Segmentação</b>	<b>Visualização</b>	<b>Sumarização</b>	<b>Associação</b>	<b>Previsão</b>
Árvores de Decisão	✓	✓	✓	✓		✓
Indução de Regras	✓	✓			✓	✓
Redes Neurais	✓	✓			✓	✓
Algoritmos Genéticos	✓	✓		✓		✓
Aproximação de Vizinhanças		✓		✓		

### III.3.1. Árvores de Decisão

As Árvores de Decisão tiveram origem na área da Aprendizagem Automática, com base na análise designada por *Automatic Interaction Detection* desenvolvida pela Universidade de Michigan. Esta análise testa automaticamente todos os valores de um determinado atributo de forma a identificar aqueles que têm uma forte associação com os registos de saída [Teixeira, 2005].

Uma Árvore de Decisão consiste, tal como o nome indica, numa estrutura arborescente, constituída por nós, ramos e folhas ou nós terminais. Os nós definem condições lógicas sobre um determinado atributo. De cada nó saem ramos representando, cada um deles, um dos valores possíveis do atributo considerado no nó. Cada folha representa uma classe. O percurso desde a raiz até uma folha corresponde a uma regra de decisão ou classificação [Teixeira, 2005].

Os algoritmos de indução de árvores de decisão utilizam a aprendizagem supervisionada, isto é, são fornecidas ao sistema as respostas correctas, a partir de um conjunto de exemplos onde, cada um deles, é formado por um vector de entrada e um vector de saída ou resposta [Rich & Knight, 1991]. A construção das árvores de decisão é feita a partir dos dados de treino, de uma forma recursiva, subdividindo-os até à obtenção de nós “puros”, em que cada nó representa apenas uma única classe, ou a satisfação de um critério de paragem [Rich & Knight, 1991].

### III.3.2. Indução de Regras

A Indução de Regras é outra das técnicas de *Data Mining* muito divulgada, que permite a detecção de tendências e padrões em grupos de dados. Esta técnica surge, muitas vezes, associada às Árvore de Decisão, sendo utilizadas para representar o conhecimento nestas apresentado [Teixeira, 2005]. A regra mais importante corresponde ao primeiro nó da árvore e as seguintes correspondem aos nós subsequentes, de acordo com a sua importância [Santos & Azevedo, 2005; Santos et al., 2005; Han & Kamber, 2006; Nisbet et al., 2009]. A representação é escrita numa sintaxe do tipo *SE condição ENTÃO acção*, onde a condição da regra especifica alguns atributos e valores e a acção prevê um valor para um atributo cuja previsão é desejada [Fayyad et al., 1996a]. As regras têm dois graus associados, o suporte e a confiança. O suporte está relacionado com o número de casos no qual a regra é encontrada, enquanto a confiança é a probabilidade condicional da regra [Quinlan, 1998].

### III.3.3. Algoritmos Genéticos

Os Algoritmos Genéticos (AG) são uma técnica de *Data Mining* inspirada na teoria da evolução de Darwin. São uma família de modelos computacionais que procuram encontrar soluções exactas ou aproximadas para um determinado problema. São uma classe particular de algoritmos evolucionários que utilizam técnicas inspiradas na biologia evolucionária, tais como cálculo de aptidão, selecção, cruzamento e mutação [Sivananda & Deepa, 2008].

A ideia original de Algoritmo Genético foi proposta por Holland e inicia-se com uma população de indivíduos gerada aleatoriamente, sendo cada indivíduo considerado como uma possível solução para o problema. A informação que é disponibilizada por cada indivíduo, e que atende aos valores dos parâmetros do problema em equação, é representada por um *cromossoma*, de uma forma em tudo semelhante à estrutura do ADN. Esses cromossomas são constituídos por um conjunto de *genes* (caracteres). Um valor possível para um *gene* é designado por alelo. A qualidade de cada solução (cromossoma) é medida por uma função chamada de aptidão, sendo os indivíduos avaliados de acordo com esta [Cortez, 2002], tal como é defendido pela teoria da evolução de Darwin. Segundo esta, os indivíduos são naturalmente seleccionados, de acordo com a aptidão que revelam perante determinado ambiente, sobrevivendo os indivíduos cujas características

hereditárias que contribuem para a sobrevivência se tornam mais comuns e sendo cada vez mais raras as características que são prejudiciais a essa mesma sobrevivência [Sivananda & Deepa, 2008].

Em cada ciclo parte-se da população actual. À semelhança do que se passa no mundo real, os indivíduos da actual população são submetidos a uma série de operações, que envolvem a selecção dos progenitores, cruzamento entre pares de progenitores e mutação dos descendentes. O resultado deste processo é o aparecimento de uma nova geração de indivíduos, repetindo-se o processo durante várias gerações até que se satisfaça uma determinada condição de paragem [Sivananda & Deepa, 2008].

### III.3.4. Aproximação de Vizinhanças

Os algoritmos de *Aproximação de Vizinhanças* estão baseados no princípio de que registos semelhantes estão próximos, quando analisados numa perspectiva espacial [Santos, 2001; Teixeira, 2005]. Cada região, identificada pela proximidade de registos, interpretados como pontos no espaço, define uma classe, ou segmento cujos registos apresentam características comuns [Botica et al., 2003]. A segmentação pode ser hierárquica, isto é, as classes estão organizadas segundo uma hierarquia (e.g. dendogramas). Quando, pelo contrário, não existe organização entre as classes a segmentação diz-se não hierárquica.

Neste tipo de abordagem é utilizada a aprendizagem não supervisionada uma vez que não é fornecido ao sistema qualquer indicação sobre as respostas correctas, sendo a sua avaliação feita pela utilidade dos agrupamentos formados.

### III.3.5. Redes Neurais Artificiais

As *Redes Neurais Artificiais* (RNAs) são modelos baseados em sistemas existentes na natureza. Na verdade são modelos simplificados do sistema nervoso central do Ser Humano. Uma RNA é composta por *neurónios artificiais* ou *nodos*, que constituem as unidades básicas de processamento e que possuem uma aptidão natural para armazenar conhecimento empírico e torná-lo acessível ao utilizador.

A semelhança de funcionamento relativamente ao cérebro humano prende-se com o facto de o conhecimento ser adquirido a partir de um ambiente, através do processo de aprendizagem, conhecimento esse que é armazenado nas ligações que se estabelecem entre os vários nodos.

Durante o processo de aprendizagem é fornecido ao modelo o ambiente de aprendizagem e o objectivo a atingir. São apresentados os casos de treino e ajustados os pesos relativos das conexões de forma a atingir esse mesmo objectivo, isto é, o estado de conhecimento da rede.

As RNAs oferecem cada vez mais a aproximação mais promissora para a construção de verdadeiros sistemas inteligentes, sendo reportada a sua utilização em inúmeras aplicações, nas mais diversas áreas do saber, com taxas de obtenção de respostas positivas muito elevadas. O poder computacional de uma RNA é sustentado por uma topologia que premeia o paralelismo e pela sua capacidade de aprendizagem e generalização, isto é, pela sua capacidade de se adaptar a novas situações com base em experiências passadas. Não se engane aquele que pense que as RNAs podem, actualmente, dar resposta a qualquer problema. A verdade é que ainda se está muito longe de atingir um sistema que consiga simular o cérebro humano, dada a sua enorme complexidade. Muitas vezes as RNAs têm de ser integradas noutras plataformas para que se consiga solucionar um determinado problema. As RNAs apresentam, ainda assim, características únicas [Azoff, 1994; Patterson, 1996; Haykin, 2008], tais como:

- **Aprendizagem e generalização:** conseguem descrever o todo a partir de algumas partes, constituindo-se como formas eficientes de aprendizagem e armazenamento de conhecimento;
- **Processamento maciçamente paralelo:** permitem que tarefas complexas sejam realizadas num curto intervalo de tempo;
- **Não linearidade:** atendendo a que a maioria dos problemas reais a equacionar e resolver são de natureza não linear;
- **Adaptabilidade:** podem adaptar a sua topologia de acordo com mudanças do ambiente;
- **Robustez e degradação suave:** permitem processar o ruído ou informação incompleta de forma eficiente. Assim, são capazes de manter o seu desempenho quando há desactivação de algumas conexões e/ou *nodos*;
- **Flexibilidade:** apresentam um grande domínio de aplicabilidade;
- **Usabilidade:** não necessitam do conhecimento prévio da função a ser aprendida.

### III.3.5.1. Neurónio Artificial ou Nodo

O termo *nodo*, muito utilizado em RNAs, faz a distinção entre neurónio natural e artificial. Os *nodos* são a unidade de processamento chave para o funcionamento de uma RNA. Existem diversos tipos de *nodos* mas o princípio de funcionamento não varia muito entre eles. Estes comportam-se como comparadores que produzem uma saída quando o valor cumulativo das entradas excede um dado valor limite.

Os *nodos* (Figura III.3) são constituídos por três elementos fundamentais [Haykin, 2008]:

- Um **conjunto de conexões**, que simbolizam as sinapses entre os neurónios. Cada conexão tem associado um peso, que confere um efeito excitatório (valores positivos) ou inibitório (valores negativos). Desta forma, o sinal ou estímulo ( $x_j$ ) é multiplicado pelo correspondente peso  $w_{ij}$ , onde  $i$  representa o *nodo* objecto de estudo e  $j$  o *nodo* emissor do sinal. Em algumas situações pode ainda existir uma conexão extra, denominada de *bias*, cuja entrada é fixada no valor +1, que estabelece uma certa tendência ou inclinação no processo computacional (adiciona uma constante para que se estabeleçam as condições operacionais correctas para o *nodo*).
- Um **integrador**, que reduz os  $n$  argumentos de entrada (estímulos) a um único valor. Frequentemente é utilizada a função adição ( $\Sigma$ ), pesando todas as entradas numa combinação linear.
- Uma **função de activação** ( $f$ ), que pode condicionar o sinal de saída, introduzindo uma componente de não linearidade no processo computacional.

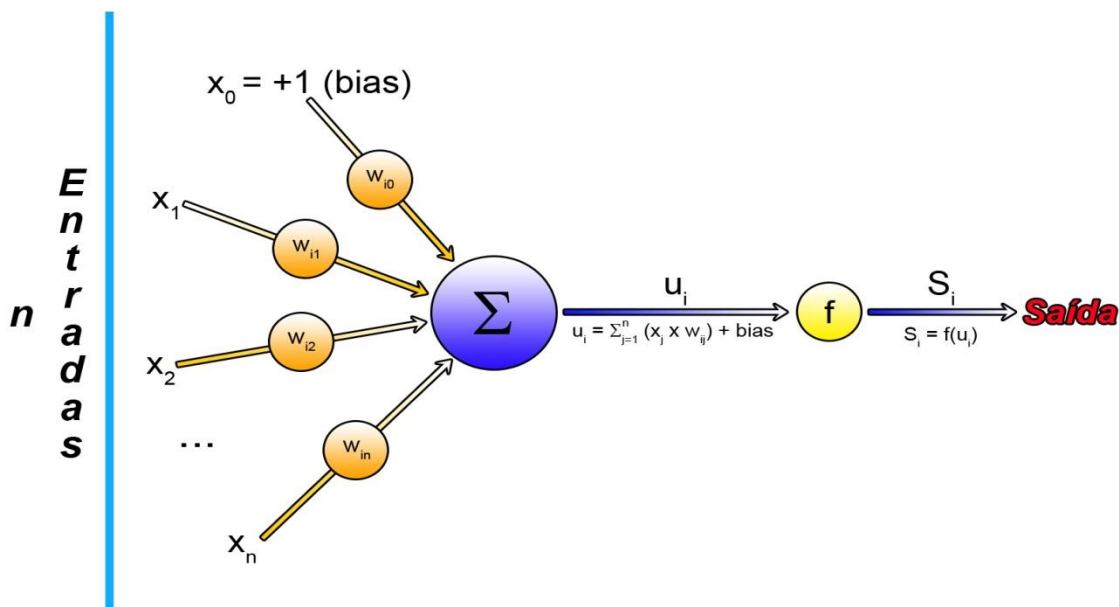


Figura III.3 – Estrutura do neurónio artificial de McCulloch e Pitts (Adaptado de Haykin, 2008)

Em termos formais um *nodo*  $i$  com  $n$  entradas e uma saída é descrito pelas seguintes equações:

$$u_i = g(w_{i1}x_1 + w_{i2}x_2 + \dots + w_{in}x_n) + bias$$

Equação III.1.

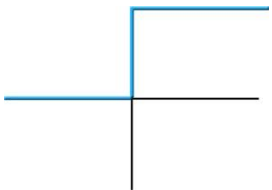
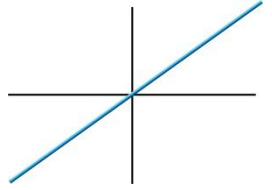
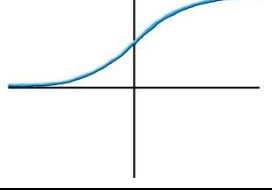
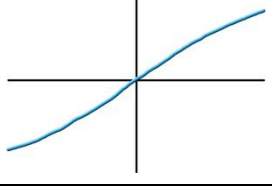
$$S_i = f(u_i)$$

Equação III.2.

Onde  $u_i$  representa o ganho do *nodo* e  $S_i$  a saída do *nodo*.

A Tabela III. 2 apresenta algumas das funções de activação mais utilizadas. A função limiar, designada também por função *Heaviside*, é usualmente utilizada em *nodos* tipo McCulloch-Pitts, em que a saída toma o valor +1 apenas se o ganho for não-negativo, obedecendo a uma filosofia de tudo ou nada. As funções de activação logística e tangente hiperbólica introduzem uma componente de não-linearidade ao processo computacional. A função logística, também designada por sigmóide, cuja forma pode ser aproximada por um “S”, é a função de activação mais utilizada em RNAs. É uma função crescente que oscila entre o comportamento linear e o não linear, tendendo para a função limiar, no limite, quando  $k$  tende para o infinito [Jordan, 1995].

Tabela III. 2 – Algumas funções de activação

Nome	Função	Representação Gráfica
Limiar ou <i>Heaviside</i>	$\begin{cases} 1, & u_i \geq 0 \\ 0, & u_i < 0 \end{cases}$	
Linear	$u_i$	
Logística ou Sigmóide	$\frac{1}{1 + e^{-k u_i}}$	
Tangente Hiperbólica	$\tanh(k u_i)$	

### III.3.5.2. Arquitecturas de rede

A forma como os *nodos* se interligam numa estrutura de rede é denominada por *arquitectura* ou *topologia* de rede. Existem vários tipos de *arquitecturas* de RNAs, cada uma delas com as suas próprias potencialidades. De uma forma geral, essas arquitecturas cabem dentro de duas categorias principais: as *Redes Neurais Unidireccionais* (RNUs) e as *Redes Neurais Recorrentes* (RNRs).

As *Redes Neurais Unidireccionais*, como o próprio nome indica, são redes nas quais a arquitectura se baseia em conexões entre camadas adjacentes que se propagam numa única direcção, não existindo, portanto, ciclos nem retrocessos (Figura III.4). Contudo, podem existir camadas intermédias cujo número é variável sendo, na maioria dos casos, uma ou duas. A arquitectura mais simples é composta por duas camadas, i.e. uma camada de entrada, cujos valores são fixados externamente e uma camada de saída.

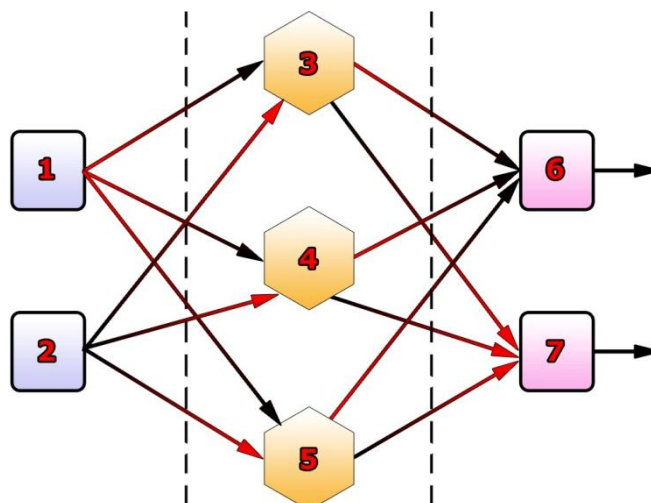


Figura III.4 – Rede Neuronal Unidireccional

As *Redes Neurais Recorrentes* simulam sistemas dinâmicos, nos quais uma saída pode, de algum modo, influenciar a entrada para esse mesmo elemento criando-se, assim, um ou mais circuitos fechados (Figura III.5). Ao conter ciclos, as saídas não são função exclusivamente das conexões entre *nodos* mas também de uma dimensão temporal, isto é, está-se na presença de um cálculo recursivo, que obedecerá naturalmente a uma certa condição de paragem, com a última iteração a ser dada com a saída para o *nodo* [Rojas, 1996].

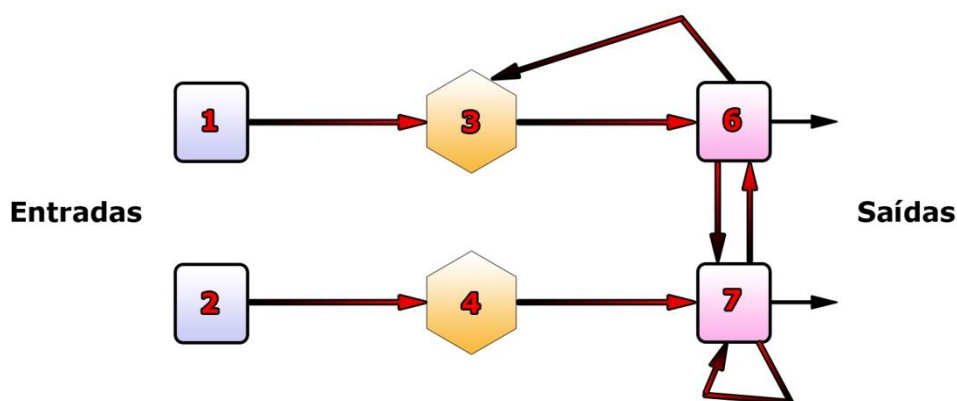


Figura III.5 – Rede Neuronal Recorrente

As RNUs constituem uma das mais importantes e populares classes de RNAs, com um vasto leque de aplicabilidade, tais como em problemas de memória associativa, classificação, reconhecimento de padrões e regressão e em diversos domínios incluindo, entre outros, Processos de Controlo Industrial, Robótica e Automação, Estatística, Medicina, Gestão e Controlo de Produção, Economia, entre outros [Patterson, 1996; Sharda & Rampal, 1996; Haykin, 2008].



RNU designa-se por completamente interligada quando contém todas as ligações possíveis entre os nodos de duas camadas adjacentes. Caso contrário, designa-se por parcialmente interligada. Por vezes existem ligações directas entre as entradas e os *nodos* de saída ou que “saltam” camadas. Estas conexões designam-se por *atalhos* [Haykin, 2008].

A não linearidade, a existência de *nodos* intermédios e o seu alto grau de conectividade tornam a arquitectura unidireccional numa máquina de aprendizagem muito poderosa. No entanto, são estas mesmas características que dificultam o entendimento do processo de aprendizagem [Haykin, 2008].

Não existe uma topologia ideal de arquitectura de uma RNU. Esta dependerá do problema a ser resolvido, do número de entradas disponíveis e da complexidade do problema em questão. Na maior parte dos casos, o estabelecimento da melhor arquitectura de rede é feito por tentativa e erro, começando-se por uma estrutura inicial que vai sendo selectivamente modificada de forma a minimizar uma métrica de erro. De um modo geral, as ferramentas disponíveis permitem escolher o modo como as redes são geradas, podendo iniciar-se o processo por uma rede de pequena ou grande dimensão à qual vão sendo, respectivamente, adicionados ou removidos *nodos* e/ou camadas intermédias, até ser atingida uma determinada condição de paragem. Outras ferramentas permitem ainda o treino paralelo de várias topologias sendo a escolhida aquela que melhor cumpra um determinado critério, como por exemplo a minimização da média do quadrado dos erros [Witten & Frank, 2005; Clementine, 2007].

Uma RNU com uma única camada intermédia permite, de acordo com o Teorema Universal de Aproximação de Funções, aprender. Alguns estudos também apontam nesse sentido [Hornik et al., 1989]. Contudo, outros autores referem que, na prática, muitas funções são difíceis de aprender com apenas uma camada intermédia [Cheng & Titterington, 1994; Flood & Kartam, 1994].

Contudo, devido às capacidades de correspondência não linear entre padrões, as RNA têm sido utilizadas com sucesso em diversos domínios, incluindo, de um modo geral para um conjunto representativo de dados de treino, uma rede com apenas uma ou, quanto muito, duas camadas intermédias permite aprender uma dada tarefa com mestria.

### III.3.5.3. Algoritmo de Retro-propagação

Relativamente ao treino de redes neuronais, o algoritmo de retro-propagação [Rumelhart et al., 1986] é tido como o algoritmo de treino mais utilizado em RNUs [Govindaraju & Rao, 2010]. Trata-se de um algoritmo de referência, sendo um método de computação eficiente para o treino de RNUs. Baseia-se em métodos de gradiente descendente e procura minimizar a função de erro no espaço de procura dos pesos, tendo em vista encontrar o conjunto óptimo de valores de pesos que, numa situação ideal, originaria as saídas correctas para uma qualquer entrada.

O algoritmo de retro-propagação envolve essencialmente duas etapas. Na primeira, denominada “propagação frontal”, são fornecidos os vectores de entrada que se propagam em frente, camada após camada e, com base nas equações III.1 e III.2, são calculadas as saídas. No final é calculado o erro entre os valores calculados e os valores reais. Na segunda etapa, denominada “retro-propagação”, o erro calculado anteriormente é propagado para trás, desde a camada de saída até à camada de entrada sendo os pesos das conexões iterativamente ajustados [Bose & Liang, 1996].

Antes de se iniciar o treino procede-se à escolha dos valores iniciais dos pesos. Em geral, estes devem ser gerados de forma aleatória, dentro do intervalo  $[-0,7; 0,7]$  [Hastie et al., 2001]. Inicia-se então o treino da rede sendo os pesos iterativamente ajustados. O processo é dado como terminado pela aplicação de critérios de paragem (e.g. quando as alterações nos pesos e no erro forem insignificantes ou até que se atinja um erro mínimo). Uma iteração considera-se terminada quando todos os exemplos de treino tiverem sido considerados.

O algoritmo de retro-propagação é controlado por dois parâmetros, o coeficiente de momento ( $\mu$ ) e a taxa de aprendizagem ( $\eta$ ), cujos valores se situam no intervalo  $[0, 1]$ . O coeficiente de momento é utilizado na fase de actualização dos pesos e visa garantir que esta seja feita de um modo consistente. Comporta-se como uma memória, tendo um efeito estabilizador em situações oscilatórias. A taxa de aprendizagem, por seu lado, controla as mudanças nos pesos. Quando  $\eta$  toma valores pequenos, próximos de zero, as mudanças produzidas são pequenas e podem tornar a aprendizagem demasiado lenta. No caso de  $\eta$  ter valores próximos da unidade as variações são demasiado grandes e podem conduzir a instabilidade no treino [Han & Kamber, 2006; Haykin, 2008].

### III.4. Avaliação de Modelos

Após a construção dos modelos é necessário inferir qual a confiança que se pode depositar na previsão de cenários futuros. Deste modo é preponderante avaliar o desempenho dos modelos gerados. São vários os métodos de amostragem disponíveis para estimar a capacidade de generalização de um modelo: estatística simples, validação por resubstituição, validação com divisão de amostra, validação cruzada e bootstrapping [Weiss & Provost, 2001; Han & Kamber, 2006; Gopalan & Sivaselvan, 2009].

No caso da validação por resubstituição [Breiman et al., 1984], após a construção do modelo este é utilizado para prever os exemplos utilizados na sua criação sendo estimado o erro associado. Este método apresenta a desvantagem de a minimização do erro estar subjacente à própria construção dos modelos. Deste modo, a estimativa do erro pode ser demasiado optimista.

O método mais utilizado para estimar o erro de generalização é, contudo, a validação com divisão da amostra. Este baseia-se numa divisão dos dados do problema em dois grupos: um primeiro grupo utilizado para treinar o modelo, de forma que este possa aprender, e um segundo grupo para testar e validar o modelo, estimando o erro de generalização. A aplicação deste método é extremamente simples e rápida. No entanto reduz o número de casos disponíveis para treino. Deve ser utilizado quando o número de dados disponíveis o permita [Larose, 2006; Bramer, 2007].

A validação cruzada é uma evolução do método de validação com divisão da amostra, que permite a utilização de todos os casos disponíveis quer para treino, quer para validação. Para conjuntos pequenos de dados, esta técnica é notavelmente melhor que a anterior. Todavia, a sua aplicação requer um considerável esforço computacional, nem sempre disponível [Bramer, 2007].

Como foi referido anteriormente, perante um dado problema, é possível e desejável gerar diversos modelos com recurso a diferentes algoritmos. Deste modo, torna-se necessário eleger o modelo mais adequado. Existem várias técnicas de avaliação dos modelos obtidos, que devem ser seleccionadas em função do tipo de problema em estudo. As mais utilizadas em tarefas de classificação são a Matriz de Confusão e as Curvas ROC, enquanto nas tarefas de regressão são utilizadas técnicas como o Desvio Absoluto Médio (DAM), Soma do Quadrado dos Erros (SQE), Média do Quadrado dos Erros (MQE), Raiz da Média do Quadrado dos Erros (RMQE) [Witten & Frank, 2005].

Os modelos de regressão tentam estimar o valor associado a cada exemplo em estudo. O melhor modelo é, naturalmente, aquele que apresenta resultados mais próximos da realidade, segundo uma medida da estimativa do erro. O erro de previsão é dado por:

$$e = d - d'$$

**Equação III.3. – Erro de previsão**

onde  $d$  representa o valor desejado e  $d'$  o valor estimado pelo modelo.

Para um conjunto de dados:  $X_1 \rightarrow d_1, \dots, X_n \rightarrow d_n$ , pode ser calculado um erro global, relativo às  $N$  observações, utilizando várias métricas como o DAM, a SQE, a MQE e/ou a RMQE.

$$DAM = \frac{\sum_{i=1}^N |e_i|}{N}$$

**Equação III.4. – Desvio Absoluto Médio**

$$SQE = \sum_{i=1}^N e_i^2$$

**Equação III.5. – Soma do quadrado dos erros**

$$MQE = \frac{SQE}{N}$$

**Equação III.6. – Média do quadrado dos erros**

$$RMQE = \sqrt{MQE}$$

**Equação III.7. – Raíz quadrada da média do quadrado dos erros**

As medidas DAM e MQE são duas das medidas mais utilizadas nos modelos de regressão. Têm a sua origem na estatística, tendo como objectivo definir o melhor estimador para um conjunto de valores. Estas medidas, quando aplicadas a este tipo de modelos, servem diferentes propósitos. Se, para o problema em questão, for aceitável cometer erros extremos, desde que a maioria dos resultados se aproxime do valor real, deve-se escolher o modelo que minimiza o valor do

DAM. No entanto, quando é preferível cometer, ainda que frequentemente, pequenos erros e evitar erros extremos deve escolher-se o modelo que minimiza o valor de MQE. Isto deve-se ao facto de a MQE utilizar o quadrado do erro, o que implica a amplificação dos erros extremos [Torgo, 1999].

Embora as métricas anteriormente apresentadas possibilitem avaliar o desempenho dos modelos de regressão, elas não fornecem informação sobre se, de um modo geral, o modelo apresenta tendência para subestimar ou sobrestimar as variáveis dependentes. O cálculo da média dos erros, denominado *bias* (Equação III.8.), pode fornecer a resposta à referida questão [Chenard & Caissie, 2008].

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^N e_i}{N}$$

**Equação III.8. – *bias***

Atendendo que  $e_i = d_i - d'_i$ , valores de *bias* predominantemente negativos significam que, em média, o modelo tem tendência para sobrestimar as variáveis dependentes enquanto que valores de *bias* predominantemente positivos significam o contrário. A representação gráfica dos erros em função dos valores previstos permite visualizar se estes se distribuem ou não de um modo aleatório e independente do valor da variável de saída.

Outra métrica comumente utilizada para avaliar o desempenho dos modelos de regressão é o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). De acordo com Chenard e Caissie [Chenard & Caissie, 2008] e com Singh e seus colaboradores [Singh et al., 2009] o coeficiente de determinação representa a percentagem de variabilidade que pode ser explicada pelo modelo, sendo calculado através da equação:

$$R^2 = \left[ \frac{N \sum_{i=1}^N d_i d'_i - \sum_{i=1}^N d_i \times \sum_{i=1}^N d'_i}{\sqrt{N(\sum_{i=1}^N d_i^2)(\sum_{i=1}^N d_i)^2} \times \sqrt{N(\sum_{i=1}^N d'^2_i)(\sum_{i=1}^N d'_i)^2}} \right]^2$$

**Equação III.9. – Coeficiente de determinação**

onde  $d_i$ ,  $d'_i$  e  $N$ , tal como anteriormente, denotam o valor observado, o valor previsto pelo modelo e o número de observações, respectivamente.

Neste contexto é também possível usar métricas relativas, nomeadamente o desvio absoluto médio relativo (DAMR), a soma do quadrado dos erros relativa (SQER), a média do quadrado dos erros relativa (MQER) ou a raiz quadrada da média do quadrado dos erros relativa (RMQER). Estas métricas são obtidas calculando o quociente entre as equações III.4, III.5, III.6 e III.7 e equações similares onde, em vez do erro,  $e_i$ , é utilizado o erro em relação à média dos valores de saída,  $\bar{e}_i = d_i - \bar{d}'_i$ , onde  $d_i$  e  $\bar{d}'_i$  denotam, respectivamente, o valor observado e o valor médio da saída  $i$  [Witten & Frank, 2005].

As principais vantagens das métricas relativas prendem-se, por um lado, com o facto de serem independentes da escala dos valores de saída e, por outro, compararem o desempenho do modelo com uma previsão simples, feita através da média dos valores. A medida relativa do erro pode apresentar valores inferiores, superiores ou iguais à unidade, significando que o modelo de previsão apresenta um desempenho melhor, pior ou similar à previsão via valor médio.

## Capítulo IV

*"Na acção está o primado da inteligência"*

Jean Piaget

### Parte Experimental

#### IV.1. Material e Equipamento Electroquímico

A análise voltamétrica aplicada neste trabalho foi realizada utilizando um potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT 20 (Eco Chemie) (Figura IV. 1), ligado a um computador que o controla a partir do programa General Purpose Electroche-



**Figura IV. 1 - Potencióstato/galvanostato Autolab PGSTAT 20 (Eco Chemie).**



**Figura IV. 2 - Posto electroquímico da Metrohm, modelo 663 VA Stand (Metrohm).**

mical System (GPES), versão 4.9. O potencióstato está ligado a um posto electroquímico (Figura IV. 2), da marca METROHM, Modelo 663 VA Stand, no qual foi montado o sistema de



**Figura IV. 3 - Interface electrónica IME 663 (Eco Chemie).**

determinação electroquímica, composto por uma célula electroquímica e um sistema de três eléctrodos. Entre o posto electroquímico e o potencióstato está intercalada uma interface electrónica IME 663 (Eco Chemie) (Figura IV. 3), que

permite formar e controlar os eléctrodos de gota de mercúrio, bem como controlar o desarejamento e agitação da solução que se encontra dentro da célula electroquímica. A agitação faz-se através de uma vareta da marca Metrohm (Figura IV. 4) que se encontra ligada a um pequeno motor que a faz girar, agitando dessa forma a solução que se encontra dentro da célula.



**Figura IV. 4 – Vareta de agitação (Metrohm).**

#### IV.1.1. Célula electroquímica

A célula electroquímica utilizada para as determinações voltamétricas é de vidro, da marca METROHM (Figura IV. 5), com a capacidade total de 90 mL. Nesta célula é colocado um tubo de plástico translúcido, que serve para introduzir na solução o gás de desarejamento, tendo sido utilizado neste caso o azoto ( $N_2$ ). São introduzidos também três eléctrodos, o eléctrodo de trabalho, o eléctrodo de referência e o eléctrodo auxiliar. O eléctrodo de referência é acoplado a uma ponte salina que estabelece o contacto entre os dois electrólitos de suporte.



**Figura IV. 5 – Célula electroquímica (Metrohm).**

#### IV.1.2. Eléctrodo de trabalho

O eléctrodo de trabalho utilizado nos varrimentos voltamétricos foi o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, HMDE. Este eléctrodo é formado a partir de um dispositivo designado por *Multi-Mode Electrode*, MME (METROHM) e que constitui um complemento ao 663 VA Stand. Este dispositivo é composto por um reservatório destinado ao mercúrio líquido e por um tubo capilar de vidro por onde passa o mercúrio até à solução, formando-se o eléctrodo na extremidade do tubo



**Figura IV. 6 – Eléctrodo Multi-mode (Metrohm).**



capilar. Todos estes componentes são da marca METROHM (Figura IV. 6). A gota forma-se na extremidade do tubo capilar pois é exercida uma pressão no mercúrio de cerca de 1 bar. Esta força é exercida pela entrada de azoto no reservatório de mercúrio.

#### IV.1.3. Eléctrodo de referência

Como eléctrodo de referência foi utilizado um eléctrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) da marca METROHM (Figura IV.7). O electrólito interno utilizado foi o cloreto de potássio (KCl) 3 mol.dm<sup>-3</sup>.



**Figura IV.8** – Recipiente que funciona como ponte salina, preparado para adaptar o eléctrodo de referência (Metrohm).

Este eléctrodo foi colocado num recipiente, da marca METROHM, contendo 5 mL de electrólito de



**Figura IV.7** – Eléctrodo de referência Ag/AgCl (Metrohm).

suporte, que funcionou como ponte salina (Figura IV.8). Este conjunto foi colocado na célula electroquímica e montado no posto electroquímico, tendo sido estabelecido o contacto eléctrico.

#### IV.1.4. Eléctrodo auxiliar

O eléctrodo auxiliar utilizado nos diversos varrimentos voltamétricos foi uma vareta de carbono vítreo, de 65 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro (Figura IV. 9). Esta vareta é aplicada num suporte que permite o contacto eléctrico quer com a solução quer com o potencióstato. Tanto a vareta como o suporte são da marca METROHM.



**Figura IV. 9** – Vareta de carbono vítreo (Metrohm).

#### IV.1.5. Equipamento auxiliar

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água Milli-Q, obtida num sistema *Simplicity*® UV, Millipore Corp., France.

O pH foi controlado utilizando um potenciómetro da marca METROHM, modelo 632, com um eléctrodo de vidro combinado.

A massa das substâncias sólidas utilizadas para preparar as soluções utilizadas foi medida através de uma balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AB204-S/FACT.

#### IV.1.6. Software

Os dados obtidos foram primeiramente recolhidos por computador, através do programa General Purpose Electrochemical System (*GPES*), versão 4.9, fabricado pela Eco Chemie B. V., na Holanda.

Posteriormente os dados foram tratados no Microsoft Excel v.14.0.5128.5000 (32 bits), produzido em 2010 pela Microsoft Corporation.

No que respeita à descoberta de conhecimento em bases de dados procurou-se uma ferramenta que permitisse implementar RNAs tendo a escolha recaído na versão 3.6 da ferramenta WEKA (*Waikato Environment for Knowledge Analysis*) [Hall et al., 2009].

### IV.2. Material e Reagentes

Neste trabalho utilizou-se material de vidro variado, nomeadamente pipetas volumétricas e graduadas para efectuar as medições de volumes, balões volumétricos onde foram preparadas todas as soluções de trabalho e copos de variados volumes. Utilizaram-se também micropipetas para a medição de volumes na ordem dos microlitros. As micro-pipetas utilizadas foram a p20, p100 e p1000, todas da marca Gilson. Os reagentes utilizados encontram-se apresentados na Tabela IV. 1, onde se indica o grau de pureza e o fabricante.

Tabela IV. 1 – Reagentes utilizados fazendo referência ao grau de pureza e fabricante

Reagente	Grau de pureza	Fabricante
Metanol	HPLC gradiente	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Dihidrogenofosfato de potássio	p.a.	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Hidrogenofosfato de sódio	p.a.	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Ácido clorídrico 30% 1,15 g.cm <sup>-3</sup>	Suprapur	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Hidróxido de Sódio	p.a.	Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanha)
Cloreto de potássio	p.a.	Metrohm
Cloreto de tributilestanho	96%	Sigma-Aldrich
Azoto	99,995%	Gasin

### IV.3. Preparação de Soluções

#### TAMPÃO FOSFATO (0,2 mol.dm<sup>-3</sup>)

A solução de tampão fosfato (0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) foi preparada dissolvendo 3,3818g de hidrogenofosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) e 4,0827g em 250 mL de água Milli-Q, ajustando o volume com água Milli-Q num balão volumétrico de 250 mL.

#### ÁCIDO CLORÍDRICO (0,01 mol.dm<sup>-3</sup>) (ELECTRÓLITO DE SUPORTE)

A solução de ácido clorídrico 0,01 mol.dm<sup>-3</sup> foi preparada a partir de ácido clorídrico *Suprapur*®, a 30% em massa (d = 1,15 g.cm<sup>-3</sup>).

#### ÁCIDO CLORÍDRICO (6 mol.dm<sup>-3</sup>)

A solução de ácido clorídrico 6 mol.dm<sup>-3</sup> foi preparada a partir de ácido clorídrico *Suprapur*®, a 30% em massa (d = 1,15 g.cm<sup>-3</sup>).

#### HIDRÓXIDO DE SÓDIO (6 mol.dm<sup>-3</sup>)

A solução de hidróxido de sódio 6 mol.dm<sup>-3</sup> foi preparada a partir do respectivo sólido.

#### TRIBUTILESTANHO

A solução de tributilestanho (TBT) foi preparada a partir de uma solução de cloreto de tributilestanho (C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>ClSn) 96% (m/m), com uma densidade de 1,20



g/cm<sup>3</sup>. Preparou-se 10mL de uma solução de concentração igual a 3540  $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ , medindo 10  $\mu\text{L}$  da solução mãe e diluindo os mesmos em 7,5 mL de água Milli-Q e 2,5 mL de metanol (HPLC gradiente).

#### IV.4. Medições Voltamétricas

O estudo electroquímico levado a cabo neste trabalho contou com a utilização de duas técnicas voltamétricas: Voltametria cíclica (CV) e Voltametria de onda quadrada de redissolução anódica (SWASV).

Utilizou-se em ambas as técnicas uma célula electroquímica, no interior da qual foram sempre colocados 20 mL de solução de electrólito de suporte.

Antes de se efectuar qualquer varrimento voltamétrico, a célula foi cuidadosamente limpa de modo a assegurar que não continha qualquer vestígio da espécie a analisar no seu interior ou de outras espécies que pudessem interferir com o comportamento electroquímico desta. Imediatamente a seguir foi colocada no posto electroquímico, já preparado com os três eléctrodos devidamente limpos e ligados electricamente como recomendado. Antes ainda de iniciar o varrimento, a solução foi desarejada através da passagem de azoto purificado (tipo C-50 da marca Gasin, com pureza igual a 99,995% e  $\text{O}_2 < 4$  ppm) durante pelo menos 15 minutos. Durante o resto do processo manteve-se uma atmosfera de azoto sobre a solução, de modo a impedir o oxigénio atmosférico de se dissolver novamente na solução, o qual pode ser reduzido electroquimicamente ou até mesmo provocar oxidações indesejadas na solução em estudo.

Foi utilizado o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE). No início das medições dispensaram-se sempre 8-10 gotas de mercúrio para garantir que o eléctrodo de mercúrio utilizado para fazer as medições não continha qualquer óxido de mercúrio na sua constituição. Após se programar o programa GPES com as condições voltamétricas desejadas e se formar a gota de mercúrio deu-se início ao varrimento.

Antes de colocar qualquer outra espécie dentro da célula foram efectuados alguns varrimentos de modo a obter a resposta voltamétrica de base do electrólito de suporte. Este procedimento permitiu aferir acerca da aplicabilidade do electrólito de suporte e detectar qualquer eventual contaminação, quer do electrólito de suporte quer do material utilizado das determinações electroquímicas. Após cada

varrimento a gota de mercúrio utilizada foi sempre dispensada, renovando-se o eléctrodo em cada varrimento voltamétrico seguinte.

As condições instrumentais utilizadas na CV e na SWASV encontram-se resumidamente descritas, respectivamente, na Tabela IV.2 e na Tabela IV.3.

**Tabela IV.2 – Condições experimentais utilizadas na voltametria cíclica**

Parâmetro	Valor ou gama de valores
Tempo de equilíbrio (s)	5
Potencial inicial (V)	-0,1
Potencial de 1. <sup>a</sup> inversão (V)	-1,1
Potencial final (V)	-0,1
Degrau de potencial (V)	0,00244
Velocidade de varrimento ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	[75; 200]

**Tabela IV.3 – Condições experimentais utilizadas na voltametria de onda quadrada de redissolução anódica**

Parâmetro	Valor ou gama de valores
Tempo de equilíbrio (s)	5
Frequência (Hz)	[25; 250]
Potencial inicial (V)	[-1,2; -0,7]
Potencial final (V)	[-0,45; 0]
Potencial de equilíbrio (V)	[-1,2; -0,7]
Degrau de potencial (V)	0,00195
Amplitude de onda (mV)	[5; 150]
Tempo de deposição (s)	[0; 30]

## IV.5. Software WEKA

A ferramenta WEKA permite desenvolver o processo de DCBD, uma vez que disponibiliza diversas formas de preparação de dados, contempla uma série de algoritmos de Data Mining e possibilita a utilização de diversos métodos, tendo em vista a validação dos resultados. A ferramenta desenvolvida na Universidade de Waikato (Nova Zelândia) faz uso das facilidades disponibilizadas pela programação orientada ao objecto, encontrando-se escrito em linguagem Java [Hall et al., 2009].

O software WEKA possui interfaces gráficas amigáveis permitindo ao utilizador escolher, logo no menu inicial, uma de quatro possíveis interfaces possibilitando, deste modo, a sua utilização por utilizadores menos familiarizados com a ferramenta. No que concerne aos dados, estes têm que estar num formato próprio do WEKA (extensão .arff), o que pode ser conseguido facilmente utilizando um conversor, disponibilizado pelo software, aplicável para ficheiros do tipo “separado por vírgulas” (extensão .csv) ou do tipo “separado por *tabs*” (extensão .tsv).

A ferramenta WEKA disponibiliza diversos algoritmos de Data Mining, entre os quais se salientam as RNAs e as Árvores de Decisão. Relativamente à validação dos resultados permite a utilização de validação com divisão da amostra e de validação cruzada. Além do exposto, permite que o utilizador defina o número de repetições tendo em vista assegurar a significância estatística dos resultados.

## Capítulo V

*"Nós somos a primeira etapa do sistema. Uma etapa absolutamente essencial que é baseada, sobretudo, na falta de um fim específico. Outras pessoas retomarão o que fizemos e serão elas que tornarão as coisas práticas. Sem nós, essas pessoas não existiriam e nós, por outro lado, não teríamos nenhuma razão de ser, sem elas."*

Carlo Rubbia, 1984

### ***Apresentação, Interpretação e Análise de Resultados e Modelos***

"A ciência é o conhecimento..." (Karl Popper) que se adquire recorrendo, essencialmente ao método científico. Método não é mais que o caminho que se tem de percorrer para atingir o fim, o objectivo a que nos propusemos. Este método passa por várias etapas, delineadas pelo cientista, onde temos sempre de incluir a observação de fenómenos primários, dedução, formulação de uma hipótese, análise da hipótese e consequente experimentação, análise dos resultados, formulação de leis e concretização dessas leis. Este método é uma espiral que se vai repetindo até que seja possível concretizar plenamente a lei formulada. Foi nesta linha que se desenvolveu este trabalho, sempre com o objectivo em mente: a busca de uma técnica eficaz para a determinação da concentração de TBT em amostras reais, que consiga ser, simultaneamente, simples e acessível.

No que concerne à análise e caracterização voltamétrica das amostras, estas foram feitas recorrendo a um potencióstato, no qual se utilizou como eléctrodo de trabalho um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), um eléctrodo auxiliar de carbono vítreo e o eléctrodo de referência utilizado foi o de Ag/AgCl. Como se sabe, o HMDE é um eléctrodo muito sensível, que produz correntes de fundo muito diminutas. Além disso, a sua superfície é facilmente renovável, o que garante uma boa repetibilidade dos resultados e a região em que é polarizável permite o estudo electroquímico do TBT.

Utilizou-se para analisar e caracterizar o comportamento electroquímico do TBT duas técnicas voltamétricas: a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de onda

quadrada de redissolução anódica (SWASV). A CV foi escolhida devido à facilidade e rapidez com que se consegue obter resultados. Esta técnica permite uma caracterização voltamétrica preliminar do analito em estudo, nomeadamente determinação da região de potencial em que o analito é electroactivo (oxidável e/ou redutível electroquimicamente), determinação do valor de pH do meio no qual os picos de intensidade de corrente apresentam melhor resolução e selecção do electrólito de suporte mais conveniente. Após o estudo e selecção do valor de pH e do electrólito de suporte mais conveniente, foi utilizada a SWASV para analisar e caracterizar o comportamento electroquímico do TBT, fazendo variar alguns parâmetros relacionados com esta técnica, nomeadamente amplitude da onda, tempo de equilíbrio, tempo de deposição, frequência, potencial inicial e final de varrimento, com o intuito de seleccionar as condições que maximizam as características do pico. Estas análises foram efectuadas com amostras de concentração conhecida e controlada, através da adição de quantidades conhecidas de TBT a quantidades fixas de água Milli-Q e tampão fosfato, permitindo desta forma uma relação entre a concentração de TBT e as características do pico de intensidade de corrente obtido, nomeadamente a sua posição, altura, área, largura a meia altura e derivada.

Este trabalho tornar-se-ia fácil caso a resposta do TBT a esta técnica permitisse traçar uma curva de calibração, onde houvesse uma equação matemática que relacionasse a concentração de TBT com uma das características do pico. No entanto tal não se verifica como será demonstrado mais à frente neste capítulo. Por isso mesmo, os resultados obtidos experimentalmente por SWASV foram sujeitos a um tratamento através de técnicas oriundas da área científica da Inteligência Artificial, mais concretamente através de redes neuronais artificiais, com o objectivo de encontrar uma tendência matemática para os resultados obtidos em função das variáveis que temos disponíveis. Desta forma, realizaram-se ensaios alterando as variáveis voltamétricas de forma a obter picos de intensidade de corrente analisáveis. Estes picos apresentam características que, sendo função das variáveis voltamétricas, foram aplicadas nas RNAs, testando vários modelos de rede, com o intuito de as relacionar com a concentração conhecida de TBT. Deste modo, não é muito relevante as dimensões dos picos resultantes de cada varrimento voltamétrico. É sim mais importante que esses picos estejam isolados de outros, que tenham uma boa resolução e linha de base e que sejam reproduzíveis. Os resultados considerados analisáveis foram todos aplicados em RNAs. Para isso utilizou-se o *software* WEKA, o qual é uma aplicação de *Data Mining* que permite de uma forma rápida desenvolver modelos preditivos com



capacidade para estudar um conjunto de dados utilizados, quer para “treinar” quer para “testar” estes modelos. Os modelos desenvolvidos foram posteriormente aplicados a um conjunto de dados de teste, de modo a comprovar a sua aplicabilidade no estudo do nosso objecto.

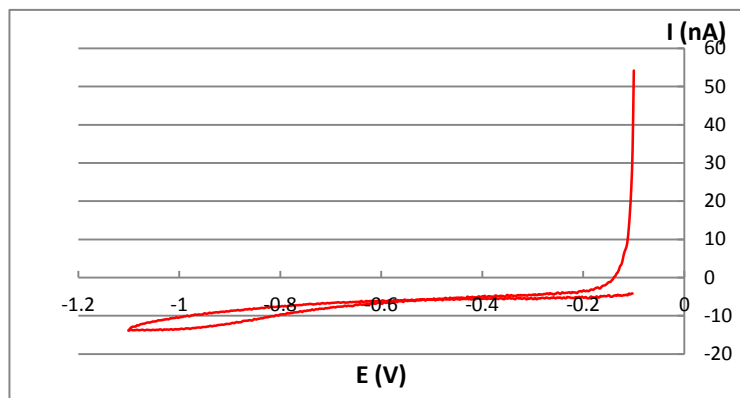
### **V.1. Estudo do Comportamento Voltamétrico do TBT com Voltametria Cíclica e Eléctrodo de Mercúrio de Gota Suspensa**

Utilizou-se a voltametria cíclica com o objectivo de observar o comportamento voltamétrico do TBT e de determinar quais as condições iniciais óptimas de pH, electrólito de suporte e velocidade de varrimento que devem ser utilizadas para se obterem picos de intensidade de corrente com melhor resolução e dimensão. Um estudo preliminar pressupõe sempre que se façam algumas opções no que concerne aos valores a testar em primeiro lugar, não sendo possível ter certezas quanto à sua adequabilidade. No entanto, com base em estudos desenvolvidos por outros autores, foram fixadas inicialmente algumas condições voltamétricas de modo a permitir o estudo posterior das condições que se julgaram mais pertinentes.

#### **V.1.1. Comportamento voltamétrico do TBT na solução electrolítica de base**

O estudo do comportamento voltamétrico do TBT, utilizando um HMDE, iniciou-se com um varrimento de potenciais na ausência de TBT, com o objectivo de inferir acerca da aplicabilidade do electrólito de suporte inicialmente seleccionado, uma solução de tampão fosfato. Não se procedeu, numa primeira fase, a nenhum ajuste de pH.

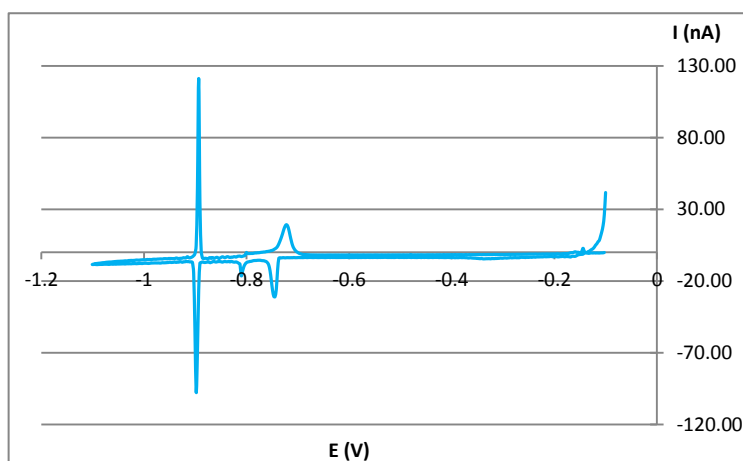
Pela análise da Figura V.2 percebe-se que o HMDE apresenta um comportamento fortemente polarizável, não havendo qualquer contribuição significativa por parte do electrólito na intensidade de corrente medida a não ser a componente capacitiva.



**Figura V.2 – Voltamograma cíclico de 20 mL de tampão fosfato  $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ , sem TBT, a pH natural, com  $E_i = -0,1 \text{ V}$ ,  $E_f = -1,1 \text{ V}$ ,  $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$  e  $t_d = 15 \text{ s}$ .**

No primeiro varrimento realizado no sentido catódico (Figura V.1), usando já uma alíquota contendo TBT, é possível observar um primeiro pico,  $E_{1pc} = -0.742 \text{ V}$ , que muito provavelmente é devido à redução do TBT adsorvido no HMDE (simplificada-mente:

$\text{Bu}_3\text{Sn}^+ + e^- \rightarrow \text{Bu}_3\text{Sn}$ ,  
 dado que é possível a presença de hidróxido ou cloro-complexos) [Bond et al., 1994]. Este pico catódico tem associado a ele um pico anódico,  $E_{1pa} = -0.730 \text{ V}$ , que se desenvolve no sentido inverso do varrimento voltamétrico e que sugere a reversibilidade do



**Figura V.1 – Voltamograma cíclico de uma mistura de 20 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ ), dopado com  $100 \mu\text{L}$  de TBT ( $3540 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ), a pH natural, com  $E_i = -0,1 \text{ V}$ ,  $E_f = -1,1 \text{ V}$ ,  $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$  e  $t_d = 5 \text{ s}$ .**

processo catódico observado. Como tal, este pico deve estar associado à oxidação electroquímica do produto  $\text{Bu}_3\text{Sn}$  adsorvido, de acordo com a reacção de eléctrodo  $\text{Bu}_3\text{Sn} \rightarrow \text{Bu}_3\text{Sn}^+ + e^-$ . Ambos os picos são repetíveis e reprodutíveis, nas condições experimentais usadas.

Entretanto, ainda no sentido de varrimento de potenciais mais negativos, observa-se que o primeiro pico catódico é seguido de um pequeno pico ( $E_{2pc} = -0.810 \text{ V}$ ), cuja natureza não é muito clara, mas que pode ser devido a reacções de electropolimerização do produto formado no passo catódico anterior, em que podem participar eventualmente as espécies  $\text{Bu}_3\text{Sn}^+$ . Este processo redox

não parece ser de todo reversível, dado que no sentido inverso do varrimento é observável apenas uma pequena onda no voltamograma (aproximadamente a -0,800V).

Na região de potencial mais negativa observa-se ainda um pico de maiores dimensões, localizado a um potencial de  $E_{3pc} = -0.898$  V. Dadas as características que revela e tendo em conta a presença de um pico complementar semelhante no sentido inverso, é muito provável que este seja devido à desadsorção dos produtos de redução e de catiões  $Bu_3Sn^+$  adsorvidos no HMDE, enquanto o pico complementar deve corresponder à adsorção dos catiões. A altura destes picos não se mantém constante, como é muitas vezes observado em sistemas semelhantes. Aliás, estes picos e os fenómenos que lhes estão associados observam-se tipicamente em eléctrodos de mercúrio estacionários, sempre que espécies químicas electroactivas ou não electroactivas apresentam um comportamento surfactante neste metal [Kissinger & Heineman, 1996].

Face aos resultados obtidos e aos objectivos pretendidos neste trabalho, a análise posterior centrou-se no estudo voltamétrico dos picos  $P_{1pc}$  e  $P_{1pa}$ .

### V.1.2. Estudo do pH

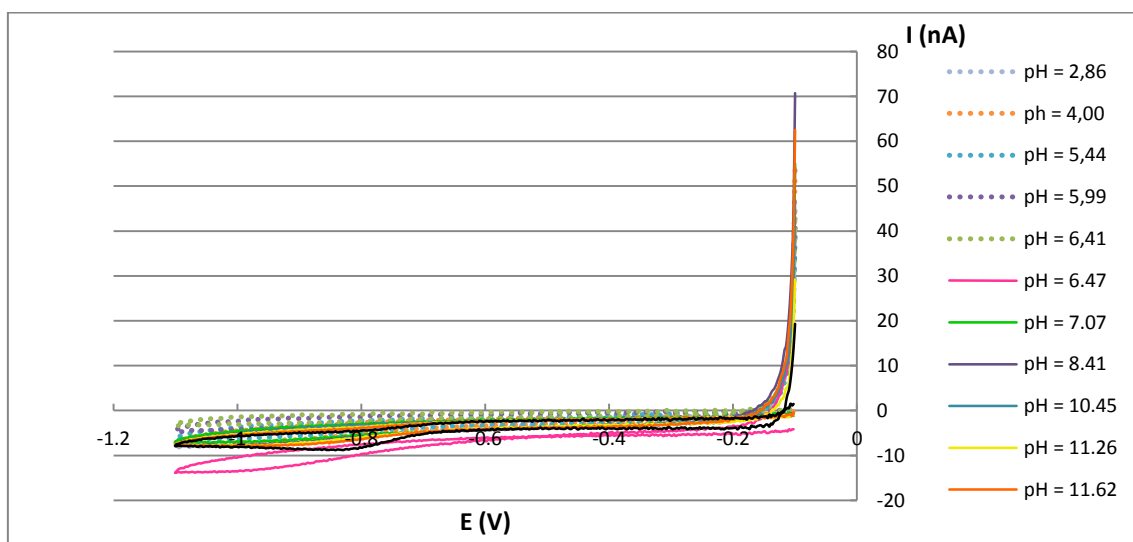
O estudo inicial de pH foi realizado utilizando 20 mL de tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup> como electrólito de suporte, 100 µL de TBT 3540 µmol.dm<sup>-3</sup>, 5 s de tempo de equilíbrio, potencial inicial igual a -0,1 V, potencial final igual a -1,1V e velocidade de varrimento de 5 mV.s<sup>-1</sup>. O pH natural deste electrólito é de aproximadamente 6,47. Estudou-se então o comportamento do TBT em meio ácido e em meio alcalino, efectuando para tal medições a diferentes valores de pH. Na Para o efeito adicionou-se à solução de tampão fosfato alíquotas apropriadas de soluções de ácido clorídrico 6 mol.dm<sup>-3</sup> ou de hidróxido de sódio 6 mol.dm<sup>-3</sup>, cujos volumes se apresentam na Tabela V.1..

**Tabela V.1. – Volumes de alíquotas de HCL/NaOH adicionados para o estudo do efeito do pH.**

$V_{HCl}$ 6 mol.dm <sup>-3</sup> (µL)	0	30	80	110	130	
pH	6,48	5,99	5,44	4,00	2,86	
$V_{NaOH}$ 6 mol.dm <sup>-3</sup> (µL)	230	450	500	600	700	950
pH	7,07	8,41	10,45	11,26	11,62	12,22

Iniciou-se o estudo com o tampão fosfato, pois segundo informação recolhida em pesquisas anteriores este parecia ser a melhor solução para se conseguir fazer uma caracterização voltamétrica do TBT. No entanto, não querendo limitar este trabalho apenas ao estudo de um electrólito de suporte, foi também testada a resposta do nosso analito usando o ácido clorídrico como electrólito de suporte, a qual, como se verá mais à frente, não permite uma caracterização voltamétrica adequada desta espécie.

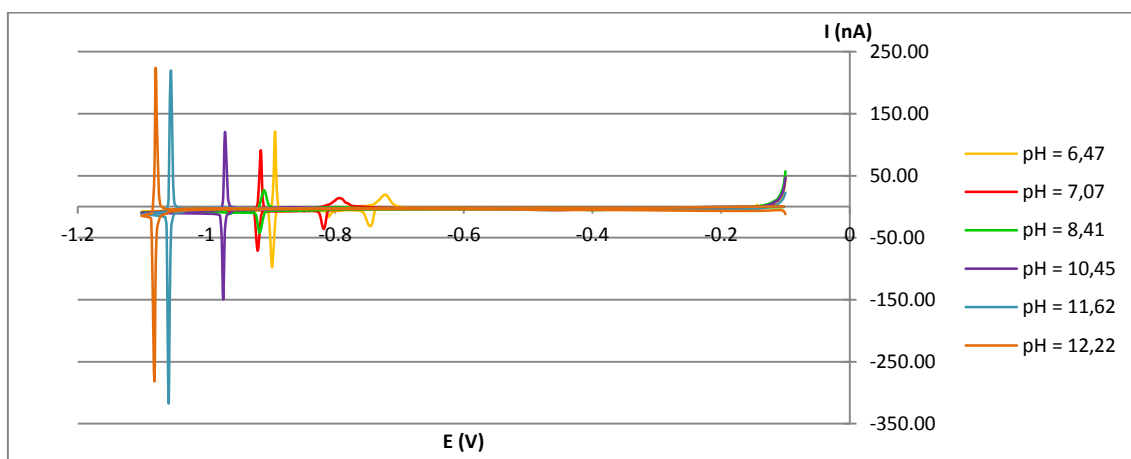
Inicialmente foram feitos varrimentos apenas com electrólito de suporte dentro da célula, para verificar que efectivamente o mesmo não produz picos na zona de potencial onde se espera obter os picos referentes ao TBT. A Figura V.3 apresenta os voltamogramas obtidos, utilizando esta técnica, para vários valores de pH contendo a célula apenas electrólito de suporte. Como se pode, verificar os voltamogramas são todos semelhantes, não sendo por isso influenciados pelo valor do pH, observando-se apenas uma ligeira translação vertical. Os resultados obtidos não parecem, à partida, vir a influenciar a análise do TBT, uma vez que a resposta em termos de intensidade é praticamente linear e que se afasta do zero cerca de 10 nA, no sentido negativo. Assim sendo, no que respeita à aplicabilidade deste electrólito de suporte, observou-se que o HMDE é, na região de potencial estudado, facilmente polarizável e que a sua resposta não varia significativamente com o valor de pH.



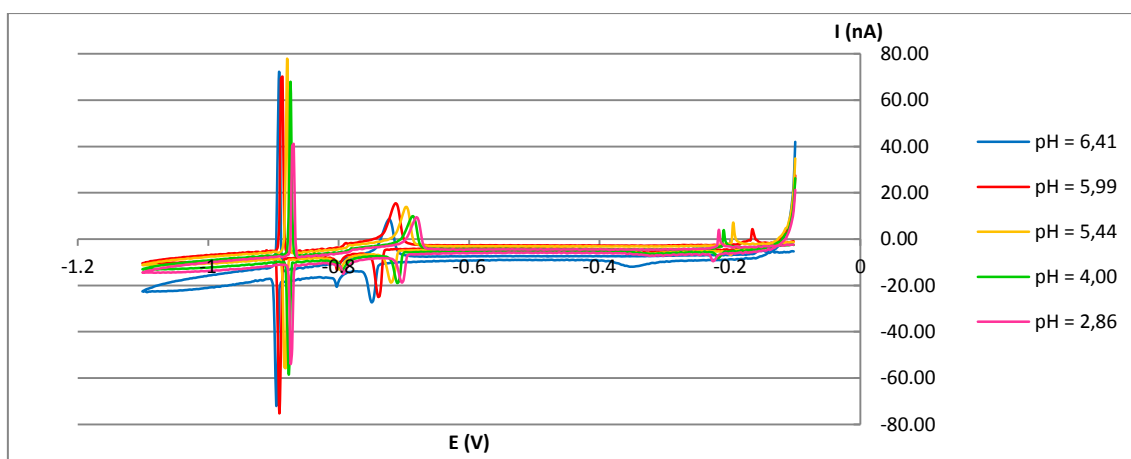
**Figura V.3 – Voltamogramas cíclicos de 20 mL de tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>, sem TBT, a diferentes valores de pH, com  $E_i = -0,1$  V,  $E_f = -1,1$  V,  $v = 5$  mV.s<sup>-1</sup> e  $t_d = 15$  s.**

Numa segunda fase adicionou-se TBT ao vaso reaccional com o intuito de perceber sob que condições de pH os picos de intensidade de corrente, relativos aos processos oxidação-redução do TBT, apresentam características analíticas

notáveis e admissíveis (i.e., altura elevada, repetibilidade e reprodutibilidade dos picos  $P_{1pc}$  e  $P_{1pa}$ ). Este estudo encontra-se sumarizado na Figura V.4, que apresenta os voltamogramas da zona alcalina, e na Figura V.5, que apresenta os voltamogramas da zona ácida. Optou-se por dividir os resultados em duas figuras para uma mais fácil leitura. Nestas figuras podem observar-se dois picos. O que aparece a valores de potencial mais negativos corresponde a fenómenos de adsorção/desadsorção de espécies no eléctrodo, enquanto aquele que ocorre a potenciais menos negativos corresponde efectivamente à redução/oxidação do TBT.



**Figura V.4** – Voltamogramas cíclicos de uma mistura de 20 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ ), dopado com  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de TBT ( $3540 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ ), com diferentes valores pH, em zona alcalina, com  $E_i = -0,1 \text{ V}$ ,  $E_f = -1,1 \text{ V}$ ,  $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$  e  $t_{\text{dep}} = 5 \text{ s}$ .



**Figura V.5** - Voltamogramas cíclicos de uma mistura de 20 mL de tampão fosfato ( $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ ), dopado com  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de TBT ( $3540 \text{ }\mu\text{mol.dm}^{-3}$ ), com diferentes valores pH, em zona ácida, com  $E_i = -0,1 \text{ V}$ ,  $E_f = -1,1 \text{ V}$ ,  $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$  e  $t_{\text{dep}} = 5 \text{ s}$ .

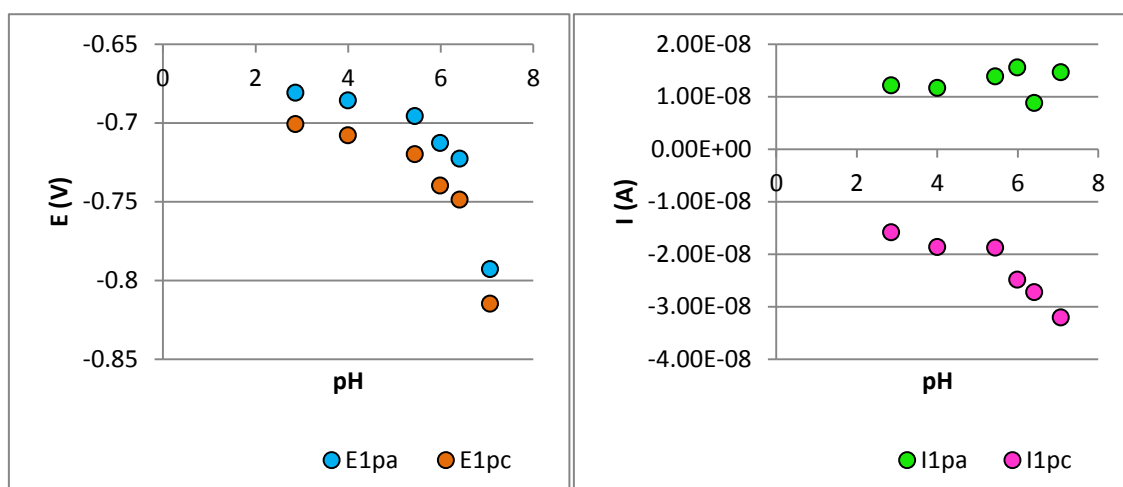
É claro, pela observação e análise dos gráficos, que o pH tem influência na posição e altura dos picos em estudo relativamente à posição dos picos catódico

( $P_{1pc}$ ) e anódico ( $P_{1pa}$ ). Observa-se que à medida que o pH da solução diminui, ambos os picos se deslocam para a região menos catódica, sugerindo que os iões  $H^+$  participam de algum modo nos processos oxidação-redução e que estes são mais favoráveis em meio ácido. Estas observações sugerem por isso, que as espécies de TBT no decurso das reacções de eléctrodo formam, em solução, hidroxocomplexos.

Quanto à intensidade dos picos constatou-se também que esta varia ligeiramente com o pH da solução. Após cuidada análise e recurso a artigos publicados por outros investigadores, constatou-se que a zona óptima para efectuar as nossas leituras será em torno do pH 5,99, dado que a altura dos picos é potenciada para valores próximos deste. Ainda assim, e porque a alteração das variáveis voltamétricas pode afectar o sinal a este valor de pH, nos estudos que se efectuaram posteriormente para as outras variáveis fez-se também variar o pH, com um leque menor de valores, para inferir acerca da validade desta conclusão.

Pode-se no entanto adiantar que todos os estudos levaram à conclusão de que o valor de pH 5,99 é o ideal para a caracterização electroquímica do TBT.

Através da análise da Figura V.6 pode-se constatar que a posição quer do pico anódico quer do pico catódico varia com o valor de pH. Verifica-se também que, para o mesmo valor de pH, a posição do pico anódico é diferente da posição do pico catódico. Já a intensidade de corrente registada para os picos anódicos apresenta pouca variação, sendo que se regista o máximo de intensidade para o valor de pH de 5,99. No que concerne ao pico catódico, apresenta maior valor absoluto de intensidade de corrente o pico correspondente a pH 7,07. Para valores de pH mais elevados não se registam voltamogramas analisáveis.

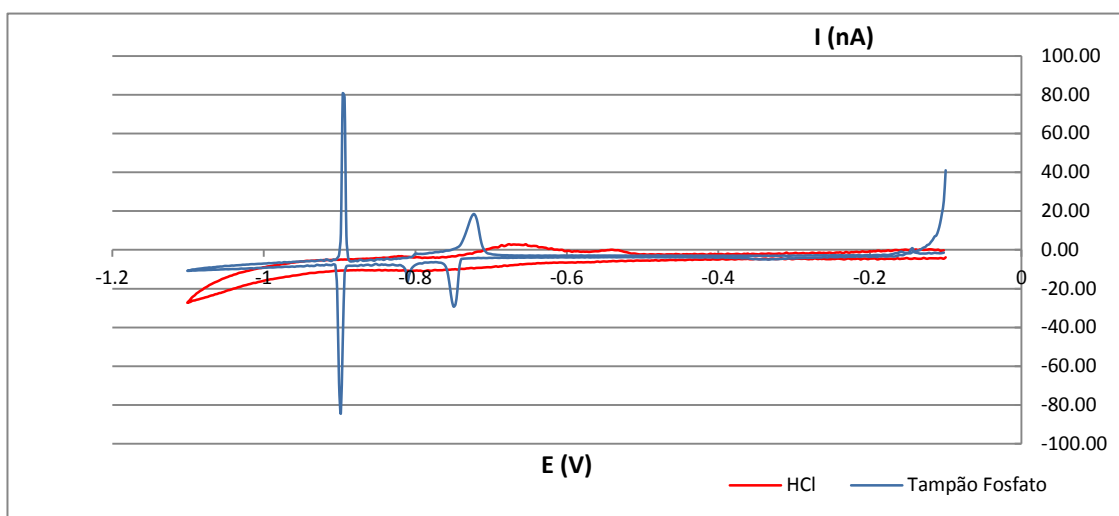


**Figura V.6** – Gráficos de valor de intensidade de corrente registada para os picos anódico e catódico em função da posição (valor de potencial).

### V.1.3. Estudo do electrólito de suporte

A solução do electrólito de suporte é uma solução iónica cuja concentração deve ser, tipicamente, 10 a 100 vezes maior que as concentrações das espécies a estudar. Este deve ser electricamente inactivo na faixa de potencial onde são realizados os estudos com o analito de interesse e deve ser quimicamente inerte, isto é, não deve reagir com o analito ou com os seus subprodutos. A principal função do electrólito de suporte é ser responsável pela quase totalidade da corrente iónica da célula, diminuindo ao mínimo a contribuição migratória da corrente, por parte da espécie electroactiva. A elevada concentração do electrólito de suporte mantém também baixa a resistência da célula e constante a força iónica da solução, impedindo que a composição da interface entre a solução e o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa se altere significativamente com a corrente proveniente da reacção [Carvalho, 2008].

Após a revisão bibliográfica de alguns artigos, constatou-se que grande parte deles faziam referência à utilização de tampão fosfato como electrólito de suporte para a caracterização electroquímica do TBT. No entanto, e não querendo ficar refém desta informação, decidiu-se efectuar alguns ensaios com outro electrólito de suporte. Um dos também mais utilizados electrólitos de suporte é o ácido clorídrico (HCl). Realizaram-se então alguns ensaios utilizando 20 mL de HCl 0,01 mol.dm<sup>-3</sup>, fazendo variar os outros parâmetros da voltametria. Verificou-se rapidamente que o HCl não poderia ser utilizado nestes ensaios pois os voltamogramas, apesar de apresentarem dois picos de intensidade de corrente, os mesmos são bastante largos, quando comparados com os picos obtidos utilizando o tampão fosfato (Figura V.7), e pouco reprodutíveis.

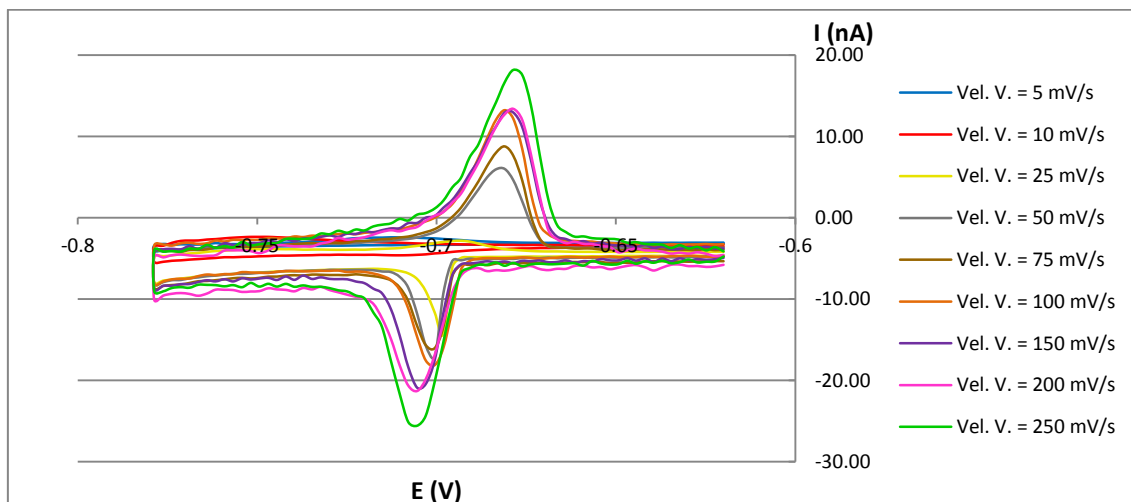


**Figura V.7** – Voltamogramas cíclicos com diferentes electrólitos de suporte e as seguintes condições de varrimento:  $E_i = -0,1$  V,  $E_f = -1,1$  V,  $v = 100$  mV.s<sup>-1</sup>,  $t_d = 5$  s e  $[TBT] = 17,61$   $\mu$ mol/dm<sup>-3</sup>.

#### V.1.4. Estudo da velocidade de varrimento

O estudo da velocidade de varrimento revela que a separação dos picos catódico e anódico aumenta, em regra, com o aumento da velocidade, sugerindo que os dois processos dependem de factores cinéticos, tais como a variação temporal da concentração das espécies electroactivas na superfície do eléctrodo. Relativamente à altura dos picos, como era esperado, esta aumentou com o aumento da velocidade de varrimento, dado que o gradiente de concentração é mais elevado nestas condições. Neste caso em particular, observou-se ainda que a análise gráfica dos valores de  $\log i_p$  em termos de  $\log v$  [Bard & Faulkner, 2001] não é conclusiva relativamente ao tipo de controlo do processo de eléctrodo, reforçando em certa medida, a ideia de que os processos de eléctrodo (catódico e anódico) envolvidos têm uma natureza complexa.

No sentido de aumentar a rapidez da análise e porque a qualidade analítica dos sinais obtidos é superior a velocidades de varrimento maiores, deve reter-se que existe a vantagem de realizar as medições a velocidades de varrimento efectivas elevadas (Figura V.8).



**Figura V.8 – Voltamogramas cíclicos fazendo variar a velocidade de varrimento, em pH ácido, utilizando amostras com  $[TBT]=17,61 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $T_{eq} = 5\text{s}$ ,  $E_i = -0,1\text{ V}$ ,  $E_f = -1,1\text{ V}$ .**

Para valores de velocidade de varrimento muito baixos o voltamograma deixa de ser analisável, tal como se pode constatar pela análise dos voltamogramas para as velocidades de varrimento 5 mV/s e 10 mV/s (Figura V.8). Ainda assim, pode afirmar-se que é possível obter picos de intensidade de corrente perfeitamente definidos para outros valores de velocidade de varrimento, passíveis de ser analisáveis pelas técnicas de DCBD pelo que não se vai, para já, limitar a análise com a SWASV para nenhum valor de velocidade de varrimento.



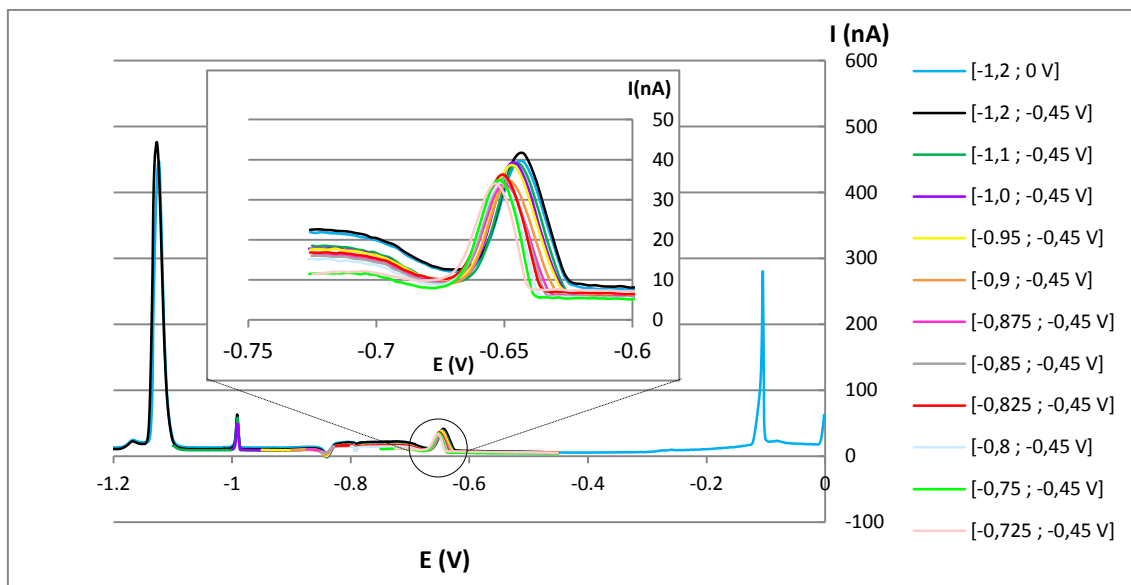
## V.2. Estudo do Comportamento Voltamétrico do TBT com SWASV e HMDE

A técnica electroquímica escolhida para a obtenção de dados analíticos do TBT foi a voltametria de onda quadrada de redissolução anódica (SWASV).

### V.2.1. Estudo do potencial

Após o estudo do analito por voltametria cíclica, verificou-se que os picos de intensidade de corrente, derivados da oxidação do TBT, surgem em potenciais que variam entre -0,6 V e -0,8 V. Esta oscilação depende das condições iniciais que são aplicadas ao varrimento de potencial. Desta forma, estudou-se a influência dos valores inicial ( $E_i$ ) e final ( $E_f$ ) de potencial na posição e características dos picos de intensidade de corrente, obtidos para a mesma concentração de TBT.

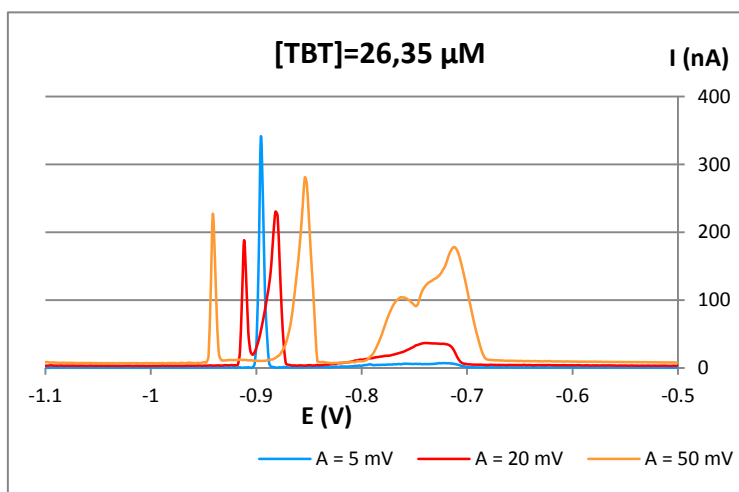
Para se estudar a influência do potencial utilizou-se uma solução constituída por 20 mL de tampão fosfato, utilizada como electrólito de suporte, dopada com diferentes volumes de TBT. Ajustou-se o valor de pH pela adição de HCl 6 mol.dm<sup>-3</sup>, para o valor de 5,99 pois constatou-se no estudo anterior ser o melhor valor para o estudo voltamétrico do analito. Fixou-se o  $t_{eq}$  em 5 s, a frequência em 25 Hz e fez-se variar a amplitude entre dois valores, 100 mV e 150 mV. Fez-se variar o  $E_i$  no intervalo [-1,2;-0,725] V e o  $E_f$  no intervalo [-0,45;0] V. Obtiveram-se então voltamogramas para cada um dos varrimentos, os quais mostram que os potenciais inicial e final não têm qualquer influência nas características e posicionamento dos picos de oxidação do TBT. Pode-se constatar isto pela observação da Figura V.9, que apresenta a variação dos potenciais inicial e final para uma solução cuja concentração de TBT é de 8,83 mol.dm<sup>-3</sup> e uma amplitude de 100 mV. Este estudo foi repetido utilizando uma amplitude de 150 mV, tendo-se chegado à mesma conclusão, isto é, que a variação dos potenciais inicial e final de varrimento não influencia as características do pico característico da oxidação do TBT. Este estudo foi realizado para soluções com diferente concentração de TBT tendo-se chegado sempre à mesma conclusão. Os gráficos relativos ao estudo do potencial para outras concentrações encontram-se no anexo II.



**Figura V.9** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução de 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 8,83  $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ . Estes voltamogramas foram obtidos com  $A=100$  mV,  $t_{\text{eq}}=5$  s,  $f=25$  Hz e pH= 5,99. O gráfico mais pequeno é uma ampliação do intervalo de potencial [-0,725;-0,55], que diz respeito à oxidação do TBT.

### V.2.2. Estudo do tempo de equilíbrio

A variável tempo de equilíbrio tem grande importância neste estudo. Constatou-se que a sua variação origina resultados muito diferentes, como se pode verificar através da análise dos voltamogramas respectivos. Efectuou-se, para isso, um estudo do tempo de equilíbrio, fazendo-o variar entre zero e quarenta segundos, com o intuito de seleccionar o(s) valor(es) que permitisse(m) obter voltamogramas analisáveis. Para um tempo de equilíbrio de zero segundos, independentemente da concentração do analito, o varrimento voltamétrico não origina picos analisáveis (Figura V.10). Os picos referentes ao TBT surgem

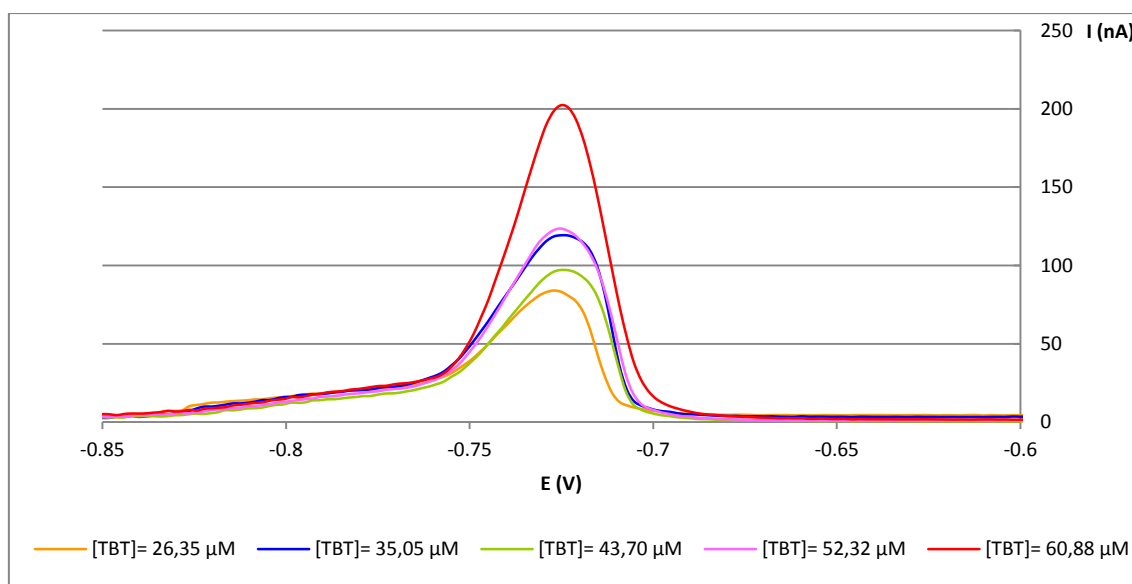


**Figura V.10** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de 26,35  $\mu\text{M}$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.



no intervalo de potencial  $[-0,65; -0,85]$  V, intervalo no qual se pode encontrar uma oscilação na intensidade de corrente detectada. No entanto a mesma não é passível de ser analisada. Os restantes voltamogramas referentes à utilização de um tempo de equilíbrio de 0 segundos, para diferentes concentrações de TBT encontram-se no Anexo III.

Entre os vários tempos de equilíbrio testados verificou-se que utilizando um tempo de equilíbrio de 5 segundos se obtêm picos com uma boa resolução, como se pode verificar pela análise da Figura V.11. Com tempos de equilíbrio mais elevados obtêm-se também bons picos de intensidade de corrente mas a sua utilização irá originar análises mais demoradas, não justificáveis pois a qualidade dos picos, no que diz respeito à resolução e altura dos mesmos, é muito semelhante. Desta forma, para todas as outras análises utilizou-se um tempo de equilíbrio de 5 segundos.



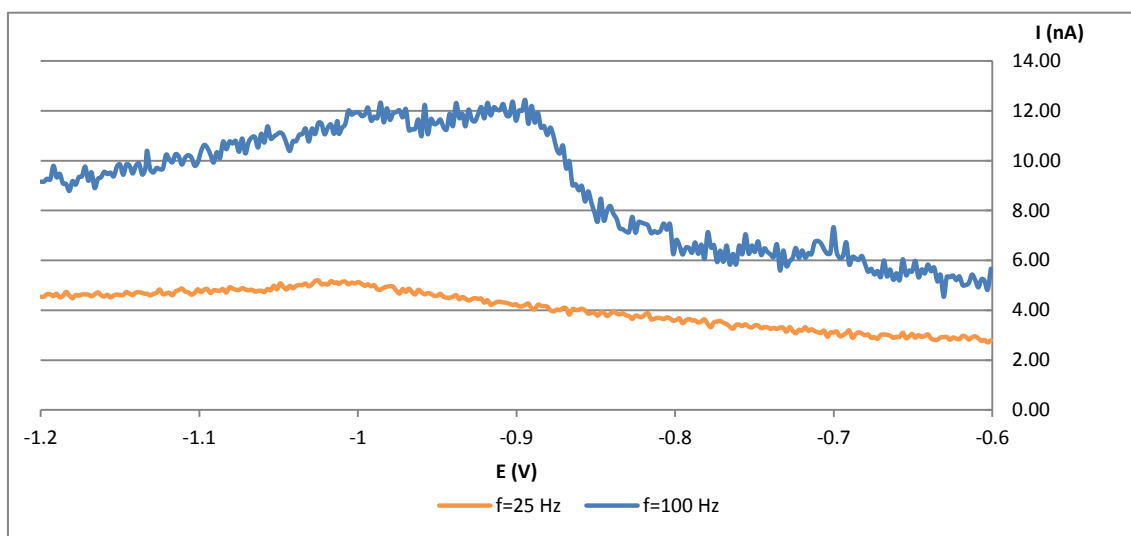
**Figura V.11** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 5 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma amplitude de 20 mV e fez-se variar a concentração de TBT, utilizando valores de 26,35 μM, 35,05 μM, 43,70 μM, 52,32 μM e 60,88 μM.

### V.2.3. Estudo da frequência

A frequência ( $f$ ) utilizada nos varrimentos, utilizando a SWASV tem, geralmente, influência nos picos quer de oxidação quer de redução das espécies em análise. De facto, a frequência é um dos parâmetros mais importantes na SWASV, uma vez que determina, em muitos analitos, a intensidade do sinal analítico e, consequentemente, a sensibilidade do método. Deste modo, um estudo de

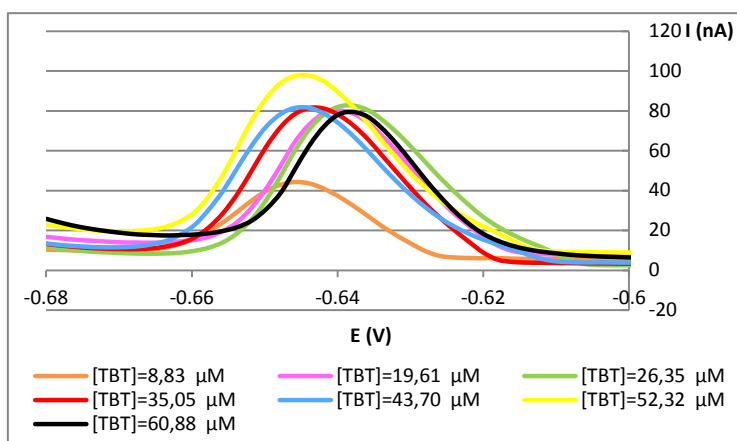
frequência para o TBT torna-se fundamental, tendo em conta que esta variável terá influência na detecção do analito e, consequentemente, na sua quantificação. Para isso, utilizou-se informação recolhida com os estudos efectuados anteriormente e fixou-se o tempo de equilíbrio no valor de 5 s. O varrimento foi efectuado no intervalo de potencial  $[-1,1; -0,5]$  V e para valores de frequência compreendidos entre 25 e 250 Hz. Utilizou-se o tampão fosfato como electrólito de suporte, fez-se variar a amplitude da onda entre três valores (20 mV, 100 mV e 150 mV) e efectuaram-se ensaios para diferentes concentrações de TBT, no intervalo  $[8,83; 60,88]$   $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ .

A primeira análise que se executou foi um varrimento utilizando apenas electrólito de suporte, na ausência de TBT. Através da análise da Figura V.12 pode-se verificar que existe menos resposta do electrólito de suporte quando se utiliza uma frequência de 25 Hz, em relação a uma frequência de 100 Hz. No entanto a diferença é pouco significativa não afectando, quer num quer noutro caso, o possível sinal a ser obtido.



**Figura V.12 – Voltamogramas fazendo um varrimento de potencial entre -0,6V e -1,2 V, com um tempo de equilíbrio de 5 s, a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma amplitude de 50 mV e na ausência de TBT. Testaram-se dois valores de frequência.**

Testaram-se posteriormente valores de frequência para diferentes concentrações conhecidas de TBT, no intervalo  $[8,83; 60,88]$   $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ . Os resultados mostram que, para as concentrações estudadas, tendo-se controlado o pH do meio para o valor de 5,99, se obtém picos com boa resolução e com uma boa linha de base, analisáveis, reproduzíveis, cujos resultados podem ser utilizados para posterior tratamento, análise e interpretação com as ferramentas de DCBD. A



**Figura V.13 – Voltamogramas fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1 V, com uma frequência de 25 Hz, tempo de equilíbrio de 5 s, a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma amplitude de 100 mV variou-se a concentração de TBT.**

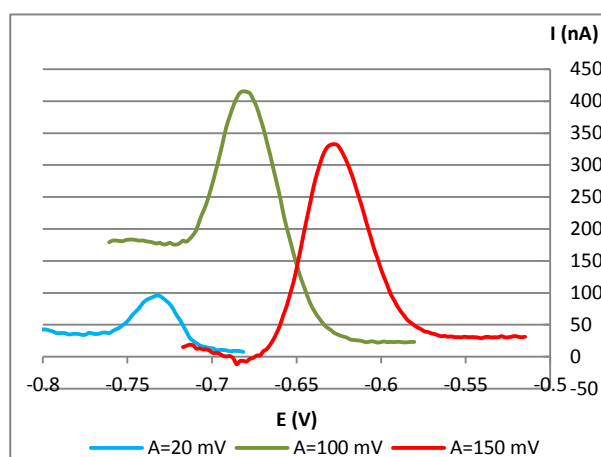
Figura V.13 apresenta um exemplo de voltamogramas obtidos para amostras contendo diferentes concentrações de TBT.

Este estudo permitiu perceber também que nem todas as combinações de frequência e amplitude permitem a obtenção de voltamogramas com um pico de oxidação do TBT analisável. Constatou-se

porém que utilizando uma frequência de 25 Hz se obtém sempre picos utilizando amplitudes de 20, 100 e 150 Hz, para as concentrações de TBT estudadas.

#### V.2.4. Estudo da amplitude

A amplitude é outra variável que se pode controlar na SWASV. Verificou-se que esta tem alguma influência na obtenção ou não de picos de intensidade de corrente analisáveis e na qualidade dos mesmos, como se viu no estudo da frequência. Como se pode observar pela análise da Figura V.14, o pico obtido para uma amplitude de 20 mV é efectivamente mais pequeno que o pico obtido para os outros dois valores de amplitude utilizados. Observa-se simultaneamente uma translação na posição do pico. No entanto, este facto, para já, não parece ser relevante pois, para a construção da base de dados a utilizar pelo sistema de *Data Mining* todos os valores são admitidos desde que sejam reproduzíveis.



**Figura V.14 – Voltamogramas de variação da amplitude fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1 V, com uma  $f = 200$  Hz,  $t_{eq}$  de 5 s, a  $pH = 5,99$ .  $[TBT] = 8,83 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .**

### V.3. Métodos Clássicos de Quantificação

#### V.3.1. Curva de calibração

A literatura internacional encontrada acerca das diversas tentativas de quantificação do TBT, utilizando técnicas electroquímicas, é pouco abundante e grande parte desta escassez de informação deve-se ao facto desta espécie não apresentar uma resposta linear e directa a esta técnica [Bond et al., 1995].

Com os dados recolhidos fez-se algumas tentativas de construção de curvas de calibração, utilizando dados recolhidos a uma frequência de 25 Hz, amplitude de 100 mV,  $E_i$  igual -1,1 V e  $E_f$  igual a -0,45 V, com um tempo de equilíbrio de 5 s e pH=5,99, representando as diversas características dos picos (posição, altura, área, largura de meia altura e derivada) em função da concentração de TBT. As figuras seguintes apresentam estas curvas de calibração.

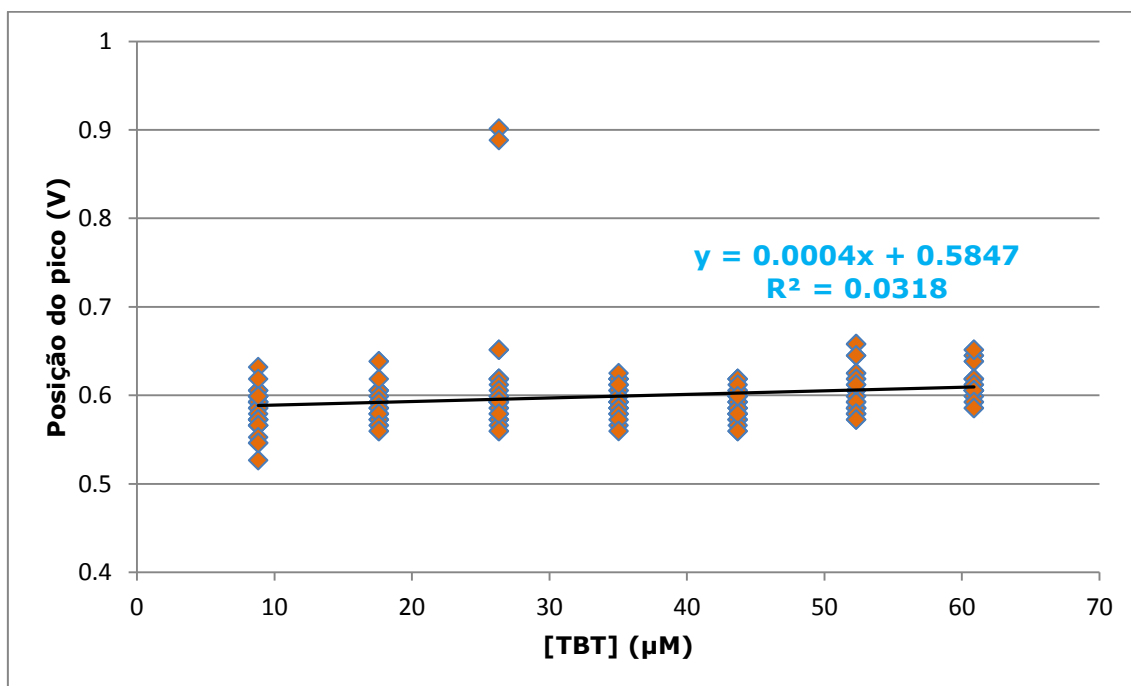


Figura V.15 – Curva de calibração (posição do pico em função da concentração de TBT).

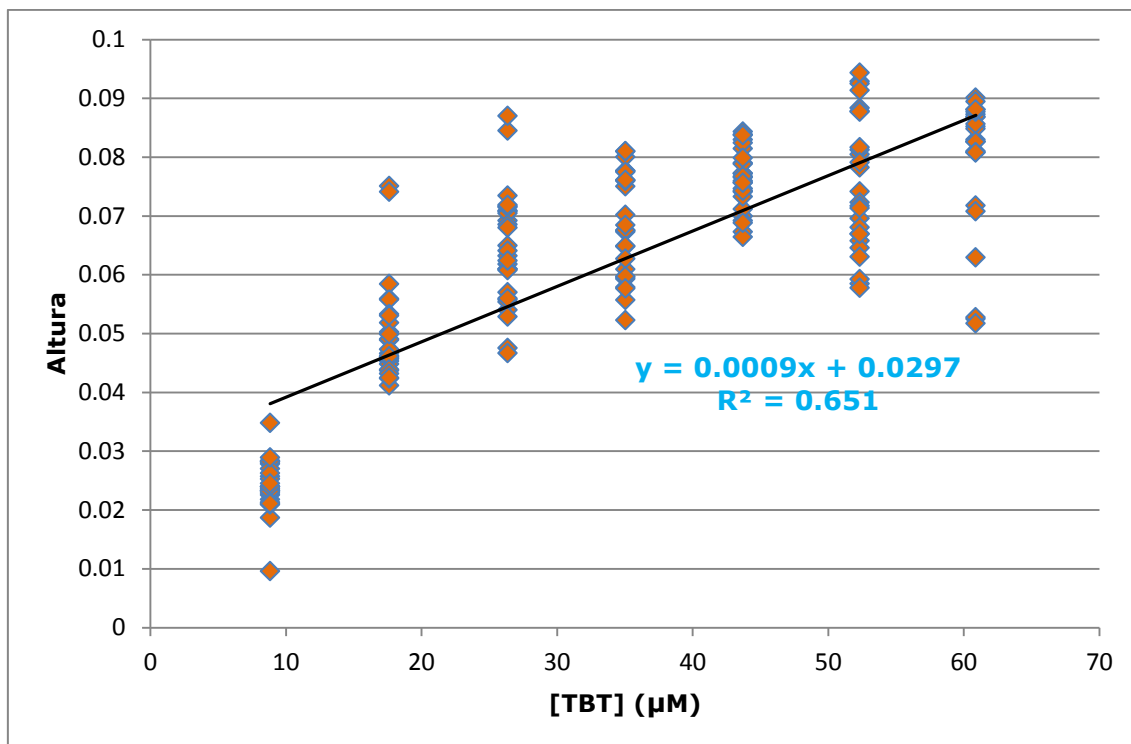


Figura V.16 – Curva de calibração (altura em função da concentração de TBT).

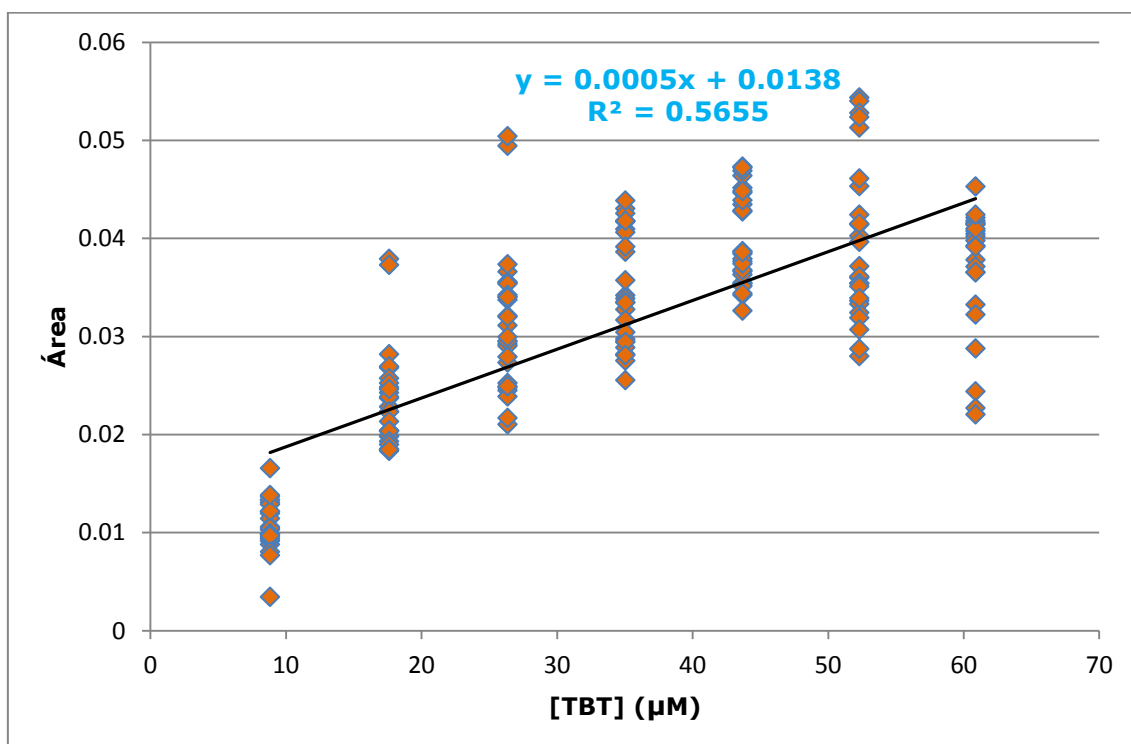


Figura V.17 – Curva de calibração (área em função da concentração de TBT).

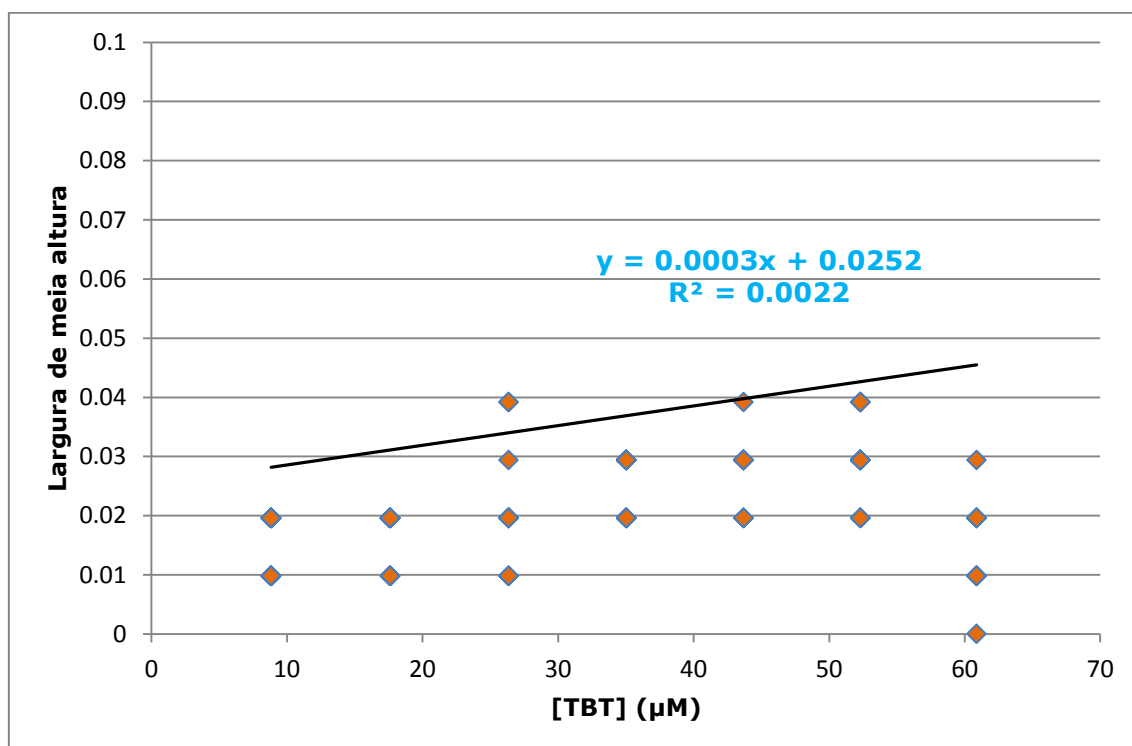


Figura V.18 – Curva de calibração (largura a meia altura em função da concentração de TBT).

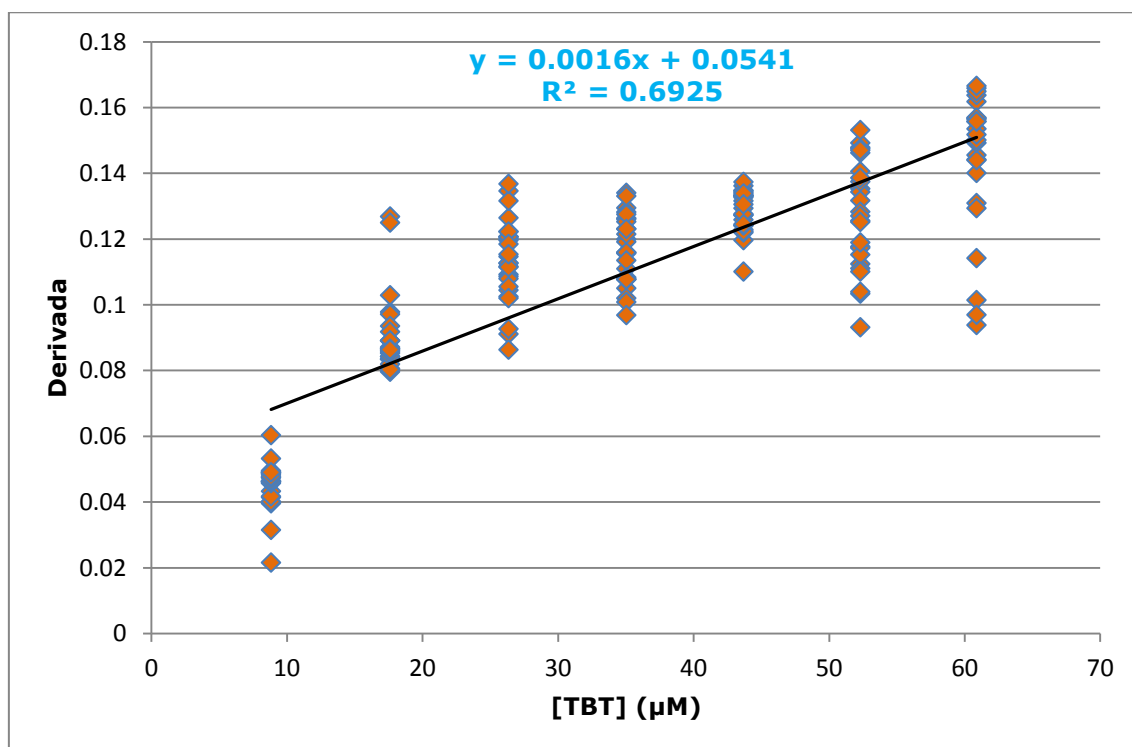


Figura V.19 – Curva de calibração (derivada em função da concentração de TBT).





Como se consegue facilmente perceber através da observação e análise das figuras anteriores, não é possível encontrar uma relação linear entre a concentração de TBT e as características retiradas dos picos de intensidade de corrente. Por conseguinte, não é possível quantificar amostras contendo TBT a partir de um método clássico, que tão bem funciona com inúmeros outros analitos. Desta forma, e por já se ter conhecimento deste facto previamente, utilizou-se a metodologia de DCBD aos dados já recolhidos, de forma a tentar encontrar modelos que consigam relacionar a concentração de TBT com os picos que ele produz, quando submetido a um varrimento voltamétrico utilizando a SWASV, fixando o tempo de equilíbrio, a amplitude, a frequência e os potenciais inicial e final, utilizando os valores que se apresentam na Tabela V.2. e que se fundamentam nos resultados discutidos anteriormente.

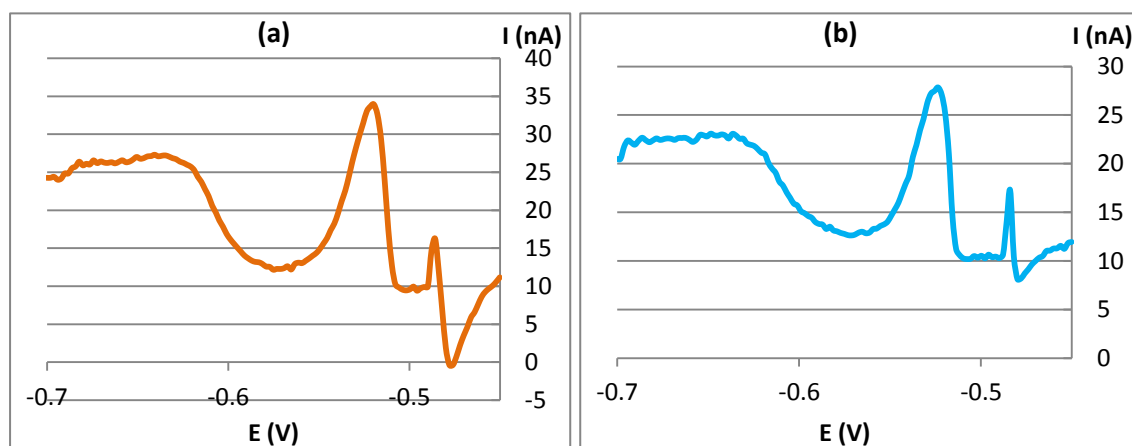
**Tabela V.2. – Parâmetros voltamétricos aplicados nos varrimentos.**

Parâmetros Voltamétricos	Valor
Tempo de equilíbrio (s)	5
Amplitude (mV)	150
Frequência (Hz)	25
Potencial inicial (V)	-0,7
Potencial final(V)	-0,45

#### V.4. Aquisição de Dados

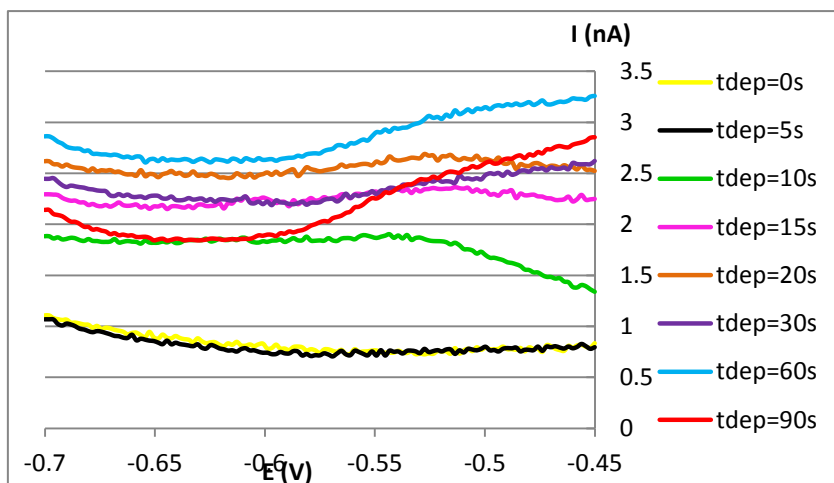
Após a escolha das condições voltamétricas que potenciam a obtenção dos picos característicos da oxidação do TBT realizaram-se SWASV com o intuito de obter voltamogramas para soluções de diferentes matrizes (água Milli-Q e água salgada recolhida no porto de Sesimbra), com diferentes concentrações de TBT conhecidas. Foram efectuados 64 varrimentos para a água Milli-Q e 65 para a água salgada. Esta análise foi efectuada no Verão, enquanto que todas as voltametrias realizadas preliminarmente, para inferir acerca das condições voltamétricas ideais para este composto, foram realizadas no Inverno. Verificou-se, por comparação directa, que não existia reprodutibilidade nos voltamogramas, o que indica desde já que a temperatura influencia o comportamento electroquímico do TBT. Ainda assim decidiu-se manter as condições voltamétricas previamente estabelecidas como

ideais nos varrimentos efectuados nesta fase. Foram utilizadas soluções com concentrações pequenas de TBT de forma a determinar também o limite de detecção desta técnica. Foram obtidos resultados quer para amostras de TBT preparadas em água Milli-Q quer para amostras de água salgada, recolhida no porto de Sesimbra, dopada com TBT. Todos os dados recolhidos foram utilizados posteriormente na construção da base de dados que servirá de suporte ao treino das RNAs. É de salientar que os resultados foram obtidos a partir de soluções nas quais existia sempre 20 mL de tampão fosfato (electrólito de suporte). Também se tentou efectuar SWASV directamente na água salgada, por ter uma elevada concentração de sais dissolvidos que poderiam funcionar como electrólito de suporte, mas verificou-se que a mesma análise não é exequível pois os voltamogramas não apresentam picos analisáveis. Os voltamogramas obtidos apresentam, na sua maioria, dois picos e não apenas um único, como acontece quando se utiliza o tampão fosfato como electrólito de suporte (Figura V.20). Para tempos de deposição mais elevados os picos desaparecem.



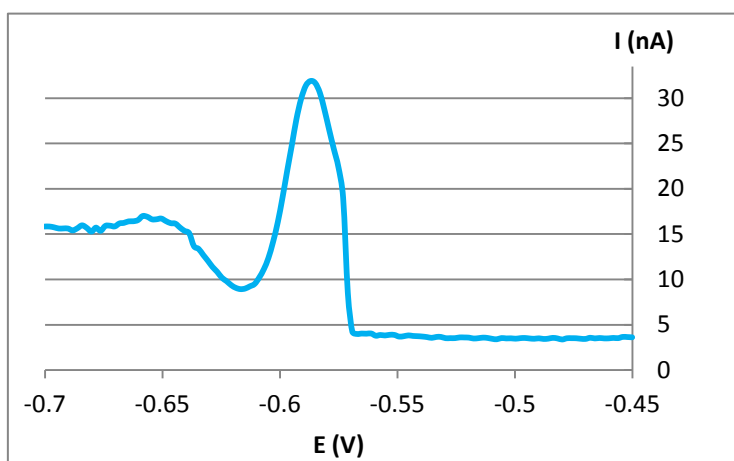
**Figura V.20 – Voltamogramas recolhidos directamente sobre uma amostra de água recolhida no porto de Sesimbra (salgada), dopada com TBT, sendo a concentração deste na solução de  $3,09 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , usando um tempo de equilíbrio de 5 s, uma frequência de 25 Hz,  $0,00195 \text{ V}$  de degrau de potencial, amplitude de 150 mV,  $E_i = -0,7 \text{ V}$ ,  $E_f = -0,45 \text{ V}$  e tempo de deposição de 5 s (a) e 15 s (b).**

Foram também efectuados varrimentos a soluções contendo apenas electrólito de suporte e água do mar, sem adição de TBT. Na Figura V.21 apresentam-se os voltamogramas obtidos para a água salgada, sem adição de TBT, na zona de potencial onde se espera aparecer o pico relativo ao TBT. Aparentemente esta água não apresenta TBT dissolvido nem nenhum outro composto que apareça neste intervalo de potenciais pois não se observam picos em nenhum dos voltamogramas obtidos, independentemente do tempo de deposição aplicado. As intensidades de corrente registadas são muito baixas, da ordem das



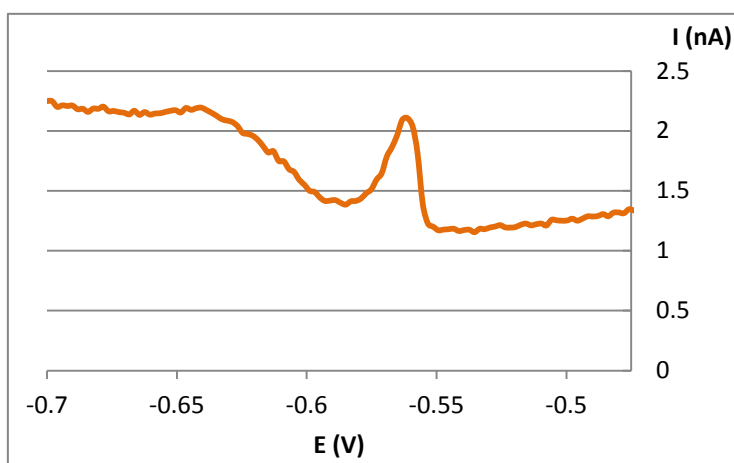
**Figura V.21** – Voltamogramas recolhidos utilizando electrólito de suporte e água do mar sem adição de TBT, sob as condições voltamétricas previamente seleccionadas, fazendo variar o tempo de deposição.

dezenas de nA, as quais não vão afectar os picos de TBT, o que significa que a matriz não encobrirá os picos do analito em estudo.



**Figura V.23** – Exemplo de voltamograma obtido para uma amostra de TBT em água Milli-Q, de concentração  $2,647 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Deste modo, nesta janela de potencial, independentemente do  $t_{\text{dep}}$  é possível analisar apenas o TBT, dopando alíquotas desta amostra de água salgada com concentrações conhecidas de TBT.



**Figura V.23** – Exemplo de voltamograma obtido para uma amostra de TBT em água salgada, de concentração  $1,325 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Posteriormente foram então dopadas amostras quer de água Milli-Q quer de água salgada com quantidades conhecidas de de TBT e foram analisadas por SWASV. A Figura V.23 apresenta um dos voltamogramas obtidos para uma análise em água Milli-Q e a Figura V.23 apresenta um dos voltamogramas obtidos para uma das análises em água salgada. Verificou-se

que a partir de uma determinada concentração os picos não alteravam a sua configuração. Isto pressupõe que o eléctrodo, a partir de determinado valor de concentração, fica saturado não conseguindo oxidar mais espécies de TBT.

### V.5. Preparação dos Dados para o Processo de DCBD

Antes de iniciar o processo de DCBD há que construir a base de dados. Atendendo aos resultados apresentados e discutidos anteriormente, os voltamogramas foram obtidos nas condições apresentadas na Tabela V.2. Utilizaram-se amostras dopadas com concentrações de TBT dentro do intervalo  $[0,883; 5,286] \mu\text{mol.dm}^{-3}$ . Como se pode constatar os valores de concentração utilizadas nesta fase são de uma ordem de grandeza 10 vezes menor que os usados para estabelecer as condições voltamétricas de trabalho. Foram testados valores de concentração ainda mais pequenos mas não foi possível, com este conjunto de condições voltamétricas previamente definidas, obter voltamogramas analisáveis.

Verificou-se que o tempo de deposição tem influência nas características do pico. Deste modo, foram efectuados varrimentos voltamétricos usando vários tempos de deposição, tendo-se obtido picos analisáveis para  $t_{\text{dep}}$  situados no intervalo  $[0, 30]\text{s}$ .

Os voltamogramas obtidos, exactamente sob as mesmas condições em matrizes diferentes (água Milli-Q e água do porto de Sesimbra) apresentam características diferentes, tendo-se optado por construir bases de dados diferentes para cada matriz testada e, por conseguinte, treinado RNAs diferentes.

Nas tabelas Tabela V.3. e Tabela V.4. apresenta-se a caracterização estatística das variáveis presentes na base de dados relativa a cada uma das matrizes estudadas.

Também foram recolhidos dados numa outra matriz, de natureza biológica, mais concretamente urina de ratos, mas os resultados obtidos não foram conclusivos, sendo necessário um estudo mais exaustivo do comportamento electroquímico do TBT nesta matriz.

**Tabela V.3. – Caracterização estatística das variáveis presentes na base de dados utilizada para as amostras de TBT em água Milli-Q.**

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Registos
$t_{\text{dep}}$ (s)	0	30	8,10	7,15	63
Posição	-0,609	-0,585	-0,593	$5,55 \times 10^{-3}$	63
Altura	$2,09 \times 10^{-9}$	$4,54 \times 10^{-8}$	$2,18 \times 10^{-8}$	$1,23 \times 10^{-8}$	63
Área	$1,98 \times 10^{-11}$	$8,25 \times 10^{-10}$	$3,52 \times 10^{-10}$	$2,43 \times 10^{-10}$	63
Largura de meia altura	$8,00 \times 10^{-3}$	$2,60 \times 10^{-2}$	$1,45 \times 10^{-2}$	$4,07 \times 10^{-3}$	63
Derivada	$2,50 \times 10^{-7}$	$7,09 \times 10^{-6}$	$3,45 \times 10^{-6}$	$1,97 \times 10^{-6}$	63
[TBT] ( $\mu\text{M}$ )	0,883	5,29	2,58	1,38	63

**Tabela V.4. – Caracterização estatística das variáveis presentes na base de dados utilizada para as amostras de TBT em água salgada.**

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	Registos
$t_{\text{dep}}$ (s)	0	30	10,156	8,308	64
Posição	-0,533	-0,577	-0,547	0,0117	64
Altura	$1,25 \times 10^{-9}$	$3,12 \times 10^{-8}$	$1,87 \times 10^{-8}$	$9,38 \times 10^{-9}$	64
Área	$1,8 \times 10^{-11}$	$7,77 \times 10^{-10}$	$4,13 \times 10^{-10}$	$2,46 \times 10^{-10}$	64
Largura de meia altura	$3 \times 10^{-2}$	$1 \times 10^{-2}$	$1,93 \times 10^{-2}$	$4,34 \times 10^{-3}$	64
Derivada	$1,411 \times 10^{-7}$	$4,272 \times 10^{-6}$	$2,537 \times 10^{-6}$	$1,23 \times 10^{-6}$	64
[TBT] ( $\mu\text{M}$ )	0,883	5,29	3,11	1,55	64

A normalização dos dados deve ser considerada antes de treinar uma rede. Embora não seja um procedimento essencial em certos casos, torna-se vital noutros. O objectivo deste procedimento é realizar uma transformação nos dados de modo a acelerar e a melhorar o processo de aprendizagem.

No presente trabalho os dados foram normalizados para o intervalo [0, 1] através da equação:

$$X_{\text{norm}} = \frac{X - X_{\text{min}}}{X_{\text{max}} - X_{\text{min}}}$$

**Equação V.1.**

Esta normalização coloca todos os resultados obtidos na mesma ordem de grandeza. A utilização dos dados sem este tratamento faz com que, muitas vezes, o algoritmo de aprendizagem atribua uma maior importância a um determinado parâmetro por este apresentar resultados com ordem de grandeza muito superior à de outros, não correspondendo essa importância à sua influência efectiva. Por exemplo, se o parâmetro  $W \in [500, 1000]$  e o parâmetro  $Y \in [0, 1]$  é possível e até bastante provável que o algoritmo de aprendizagem atribua uma importância inadequada ao atributo  $W$  em consequência de ele apresentar um domínio mais alargado e uma ordem de grandeza superior [Pyle, 1999; Han & Kamber, 2006; Bramer, 2007].

## V.6. Modelação

Antes de se iniciar a fase de construção dos modelos devem ser definidos claramente os objectivos a atingir bem como o conjunto das variáveis de entrada e de saída. Deste modo, tendo em vista a quantificação dos níveis de TBT em amostras biológicas e não biológicas, procurou-se obter modelos que permitam, com base nas características dos picos voltamétricos obtidos após a aplicação da SWASV, determinar a concentração de TBT.

Neste trabalho recorreu-se às Redes Neurais Artificiais (RNAs) devido ao facto de estas serem consideradas, actualmente, como ferramentas capazes de apreender e representar relações complexas entre as variáveis. Além disso, esta técnica tem sido aplicada a problemas dentro da área científica da Electroquímica [Ensafi et al., 2002; Ensafi et al., 2006; Esteban et al., 2006; Cabanillas et al., 2007; Wei et al., 2011; Bhattacharyya et al., 2012; Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2012].

De entre as várias arquitecturas de rede que se conhecem, optou-se pela utilização de Redes Neurais Unidireccionais (RNUs) pois é uma das mais utilizadas em problemas de regressão. Como foi referido anteriormente, não existem regras claras para estabelecer o número de camadas intermédias ou o número de *nodos* que as constituem. Assim sendo, neste trabalho optou-se pelo procedimento mais utilizado que começa numa estrutura inicial simples que vai sendo selectivamente modificada de forma a minimizar uma métrica de erro que, neste trabalho, foi a média do quadrado dos erros (MQE) [Witten & Frank, 2005].

O algoritmo de treino utilizado foi o algoritmo de retropropagação que, tal como foi referido anteriormente, tem sido apontado como o algoritmo de treino supervisionado mais utilizado em RNUs. Utilizou-se como função de activação a função sigmóide. Em todos os casos utilizaram-se os valores sugeridos pelo *software* WEKA relativos aos parâmetros de configuração.

Tendo em vista assegurar a significância estatística dos resultados obtidos, cada simulação foi executada vinte vezes. Em cada uma delas os registos da base de dados foram aleatoriamente divididos em dois conjuntos mutuamente exclusivos. O conjunto de treino, composto por 50% dos exemplos e o conjunto de teste, constituído pelos restantes 50%.

Na Tabela V.5. encontram-se os valores do Desvio Absoluto Médio (DAM), da Média do Quadrado dos Erros (MQE) e de *bias* para as topologias de rede testadas, quer para o conjunto de treino quer para o conjunto de teste, para amostras preparadas em água Milli-Q. A Tabela V.6., por seu lado, apresenta os valores do DAM, da MQE e de *bias* para as topologias de rede testadas, quer para o conjunto de treino quer para o conjunto de teste, para as amostras preparadas em água recolhida no porto de Sesimbra.

**Tabela V.5. – Valores de DAM, MQE e *bias* para as topologias de rede testadas em amostras de água Milli-Q.**

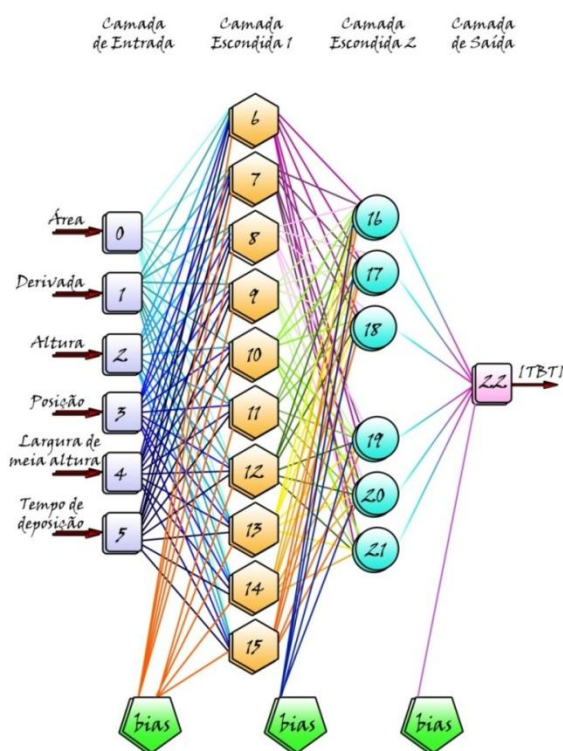
Topologia da rede	DAM		MQE		Bias	
	C. Treino	C. Teste	C. Treino	C. Teste	C. Treino	C. Teste
4-7-5-1	$1,06 \times 10^{-5}$	$1,27 \times 10^{-5}$	$2,04 \times 10^{-10}$	$3,25 \times 10^{-10}$	$6,11 \times 10^{-7}$	$-1,13 \times 10^{-6}$
5-6-4-1	$8,58 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-10}$	$2,56 \times 10^{-10}$	$3,38 \times 10^{-7}$	$1,09 \times 10^{-7}$
6-4-4-1	$7,60 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{-5}$	$1,13 \times 10^{-10}$	$2,40 \times 10^{-10}$	$2,49 \times 10^{-7}$	$-2,19 \times 10^{-7}$
6-4-5-1	$5,77 \times 10^{-6}$	$7,31 \times 10^{-6}$	$7,05 \times 10^{-11}$	$1,21 \times 10^{-10}$	$-3,36 \times 10^{-7}$	$2,10 \times 10^{-7}$
6-5-4-1	$1,37 \times 10^{-5}$	$1,83 \times 10^{-5}$	$3,62 \times 10^{-10}$	$5,08 \times 10^{-10}$	$8,00 \times 10^{-7}$	$-1,43 \times 10^{-6}$
6-5-5-1	$7,73 \times 10^{-6}$	$1,42 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-10}$	$3,23 \times 10^{-10}$	$-5,93 \times 10^{-7}$	$7,56 \times 10^{-7}$
6-6-3-1	$8,51 \times 10^{-6}$	$8,83 \times 10^{-6}$	$1,17 \times 10^{-10}$	$1,16 \times 10^{-10}$	$4,81 \times 10^{-7}$	$-3,19 \times 10^{-7}$
6-6-4-1	$1,32 \times 10^{-5}$	$1,93 \times 10^{-5}$	$3,16 \times 10^{-10}$	$7,28 \times 10^{-10}$	$1,35 \times 10^{-6}$	$-1,60 \times 10^{-6}$
6-8-4-1	$4,88 \times 10^{-6}$	$7,20 \times 10^{-6}$	$4,22 \times 10^{-11}$	$1,11 \times 10^{-10}$	$-3,70 \times 10^{-7}$	$1,35 \times 10^{-7}$
6-10-6-1	$4,10 \times 10^{-6}$	$6,18 \times 10^{-6}$	$3,00 \times 10^{-11}$	$8,37 \times 10^{-11}$	$2,18 \times 10^{-7}$	$-1,92 \times 10^{-8}$
6-14-6-1	$8,98 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-5}$	$1,79 \times 10^{-10}$	$2,33 \times 10^{-10}$	$8,09 \times 10^{-7}$	$-9,79 \times 10^{-7}$

Da análise da Tabela V.5. verifica-se que, para a água Milli-Q, a rede que minimiza o DAM e a MQE é a que apresenta a topologia 6-10-6-1 enquanto a Tabela V.6. mostra que a topologia 6-12-5-1 minimiza o DAM e a MQE, para a água salgada. Estas topologias apresentam, também, valores de *bias* muito próximos de zero, o que significa que não têm tendência para subestimar ou sobrestimar a

variável de saída (concentração de TBT). Atendendo ao exposto, foram seleccionadas as topologias 6-10-6-1 e 6-12-5-1 para modelar a concentração de TBT, respectivamente, em água Milli-Q e água salgada. As referidas RNAs são apresentadas na Figura V.24 e Figura V.25 que, como se pode observar, são constituídas por seis nós na camada de entrada (a área, a derivada, a altura, a posição, o potencial inicial e o potencial final de varrimento), duas camadas escondidas e um nó na camada de saída (concentração de TBT).

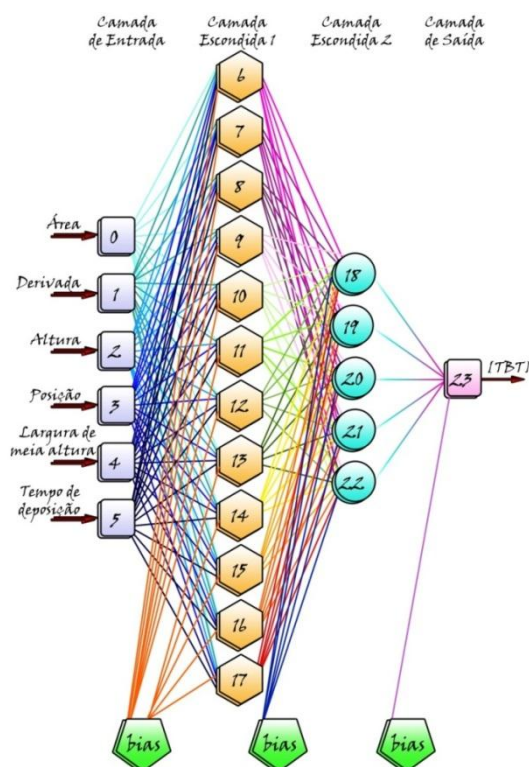
**Tabela V.6. – Valores de DAM, MQE e *bias* para as topologias de rede testadas em amostras de água do porto de Sesimbra.**

Topologia da rede	DAM		MQE		Bias	
	C. Treino	C. Teste	C. Treino	C. Teste	C. Treino	C. Teste
5-7-5-1	$2,11 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-9}$	$2,15 \times 10^{-9}$	$4,93 \times 10^{-6}$	$-2,32 \times 10^{-7}$
5-8-2-1	$1,73 \times 10^{-5}$	$2,93 \times 10^{-5}$	$8,75 \times 10^{-10}$	$2,22 \times 10^{-9}$	$9,89 \times 10^{-7}$	$5,07 \times 10^{-6}$
5-9-4-1	$1,50 \times 10^{-5}$	$2,35 \times 10^{-5}$	$6,13 \times 10^{-10}$	$1,67 \times 10^{-9}$	$2,10 \times 10^{-6}$	$5,67 \times 10^{-7}$
5-11-3-1	$3,95 \times 10^{-5}$	$4,44 \times 10^{-5}$	$3,17 \times 10^{-9}$	$5,42 \times 10^{-9}$	$9,99 \times 10^{-6}$	$-6,88 \times 10^{-6}$
5-13-6-1	$5,96 \times 10^{-1}$	$6,34 \times 10^{-1}$	$4,20 \times 10^{-1}$	$4,50 \times 10^{-1}$	$5,95 \times 10^{-1}$	$6,34 \times 10^{-1}$
6-6-3-1	$1,74 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-5}$	$9,16 \times 10^{-10}$	$9,76 \times 10^{-10}$	$5,52 \times 10^{-6}$	$-1,46 \times 10^{-6}$
6-9-2-1	$1,17 \times 10^{-5}$	$1,88 \times 10^{-5}$	$3,89 \times 10^{-10}$	$6,76 \times 10^{-10}$	$4,07 \times 10^{-6}$	$-3,18 \times 10^{-7}$
6-9-3-1	$5,64 \times 10^{-6}$	$8,41 \times 10^{-6}$	$6,00 \times 10^{-11}$	$1,20 \times 10^{-10}$	$9,01 \times 10^{-7}$	$6,25 \times 10^{-7}$
6-4-1-1	$2,19 \times 10^{-5}$	$2,23 \times 10^{-5}$	$1,19 \times 10^{-9}$	$9,70 \times 10^{-10}$	$1,74 \times 10^{-6}$	$1,86 \times 10^{-6}$
6-12-5-1	$3,98 \times 10^{-6}$	$5,69 \times 10^{-6}$	$3,73 \times 10^{-11}$	$6,27 \times 10^{-11}$	$8,45 \times 10^{-7}$	$3,78 \times 10^{-7}$
6-15-3-1	$3,95 \times 10^{-5}$	$4,44 \times 10^{-5}$	$3,17 \times 10^{-9}$	$5,42 \times 10^{-9}$	$9,99 \times 10^{-6}$	$-6,88 \times 10^{-6}$



**Figura V.24 – RNA seleccionada para a previsão da concentração de TBT em água Milli-Q.**

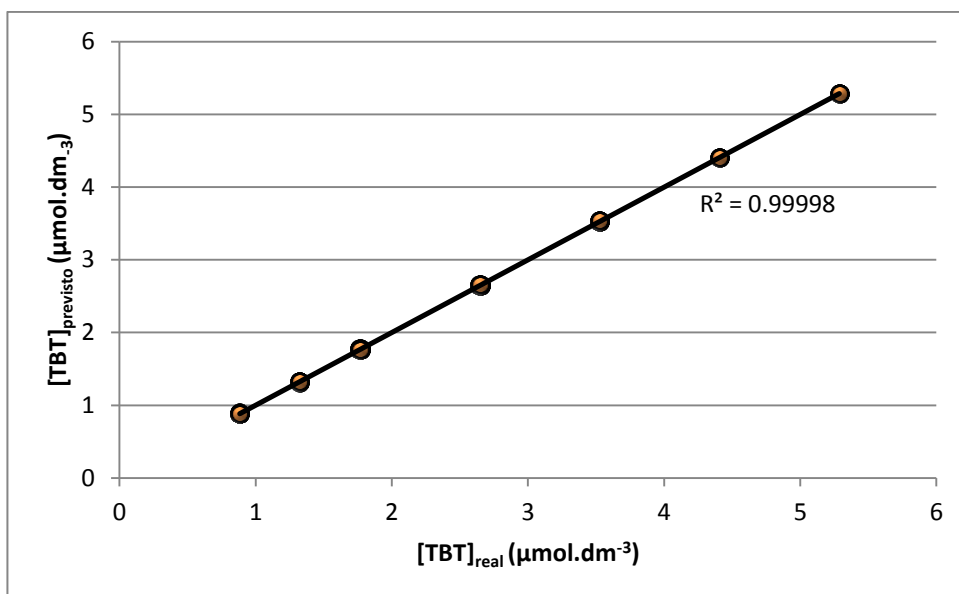




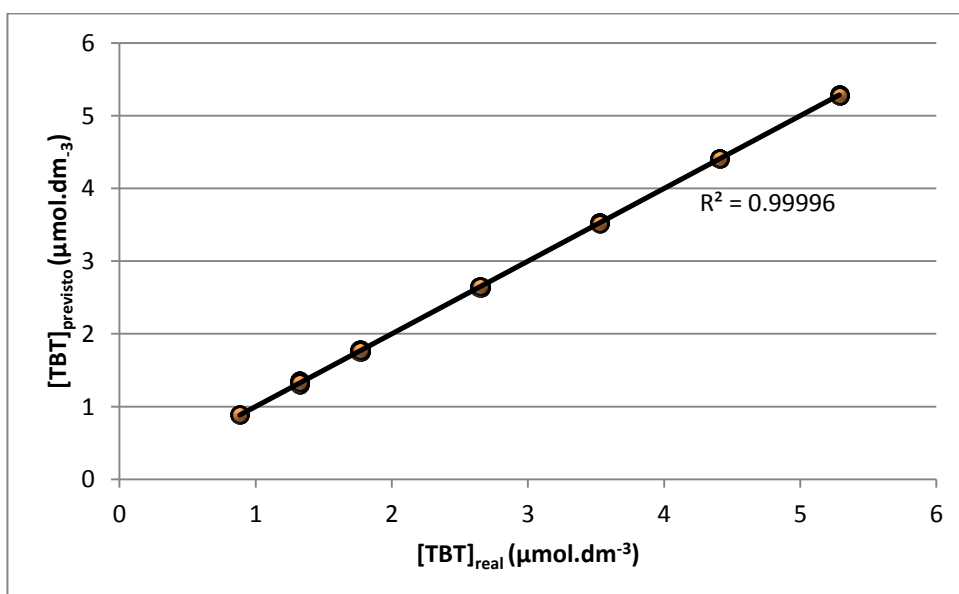
**Figura V.25 – RNA seleccionada para a previsão da concentração de TBT em água salgada.**

Com o objectivo de avaliar o desempenho dos modelos seleccionados traçaram-se representações gráficas dos valores de concentração de TBT previstos em função dos valores reais, tanto para o conjunto de treino como para o conjunto de teste indicando-se, em cada um dos casos, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), quer para as amostras em água Milli-Q quer para as amostras em água salgada.

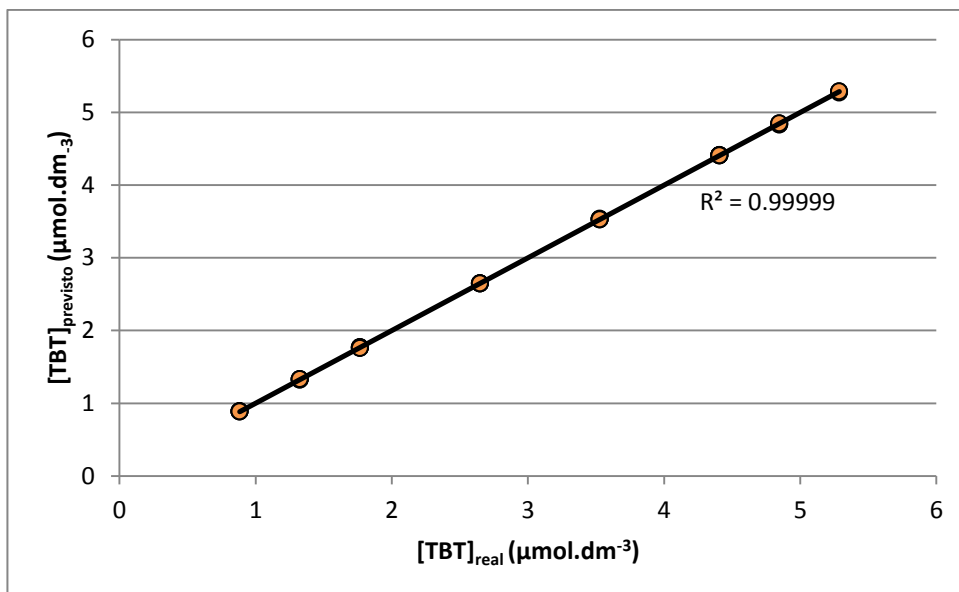
A análise da Figura V.26 e da Figura V.27 (para as amostras de TBT em água Milli-Q), e da Figura V.28 e da Figura V.29 (para as amostras de TBT em água salgada) mostra que as RNAs seleccionadas apresentam uma elevada capacidade de previsão da concentração de TBT a partir das características do pico voltamétrico em todo o intervalo de valores de ensaio, tanto para o conjunto de treino como para o conjunto de teste. Um outro aspecto importante é o facto de os valores de  $R^2$  relativos aos conjuntos de treino e de teste serem semelhantes. Este resultado parece mostrar que o modelo não apresenta problemas de sobre-ajustamento.



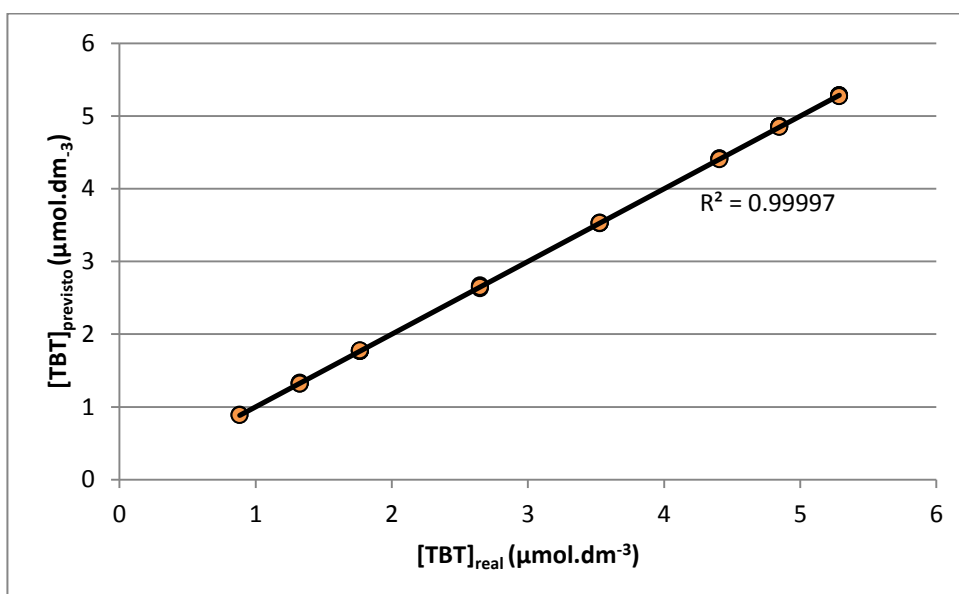
**Figura V.26** – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água Milli-Q para o conjunto de treino.



**Figura V.27** – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água Milli-Q para o conjunto de teste.

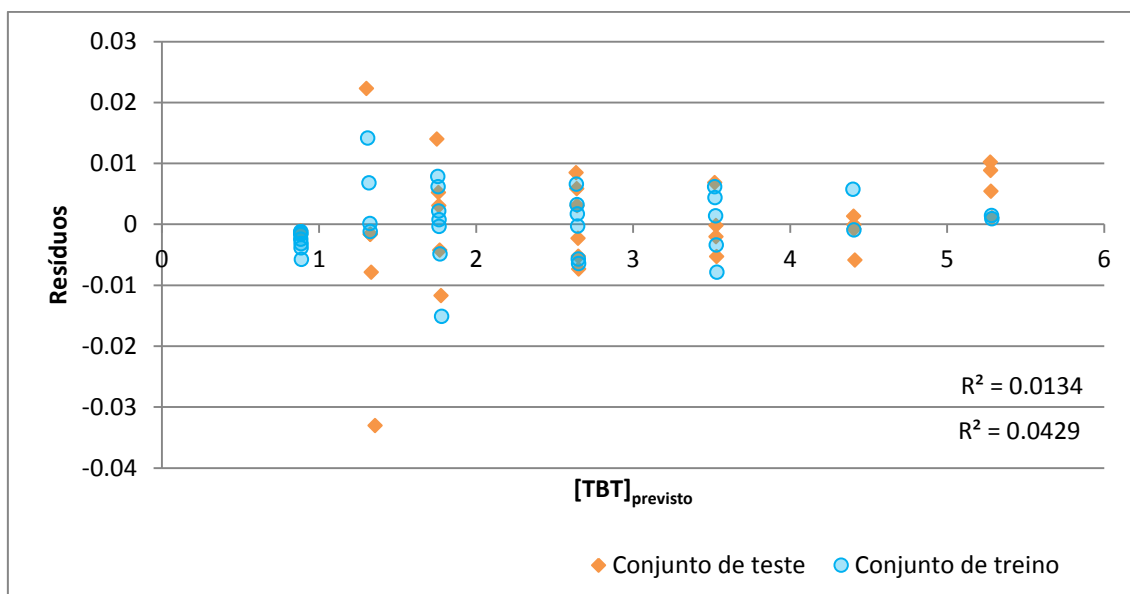


**Figura V.28** – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água do porto de Sesimbra para o conjunto de treino.

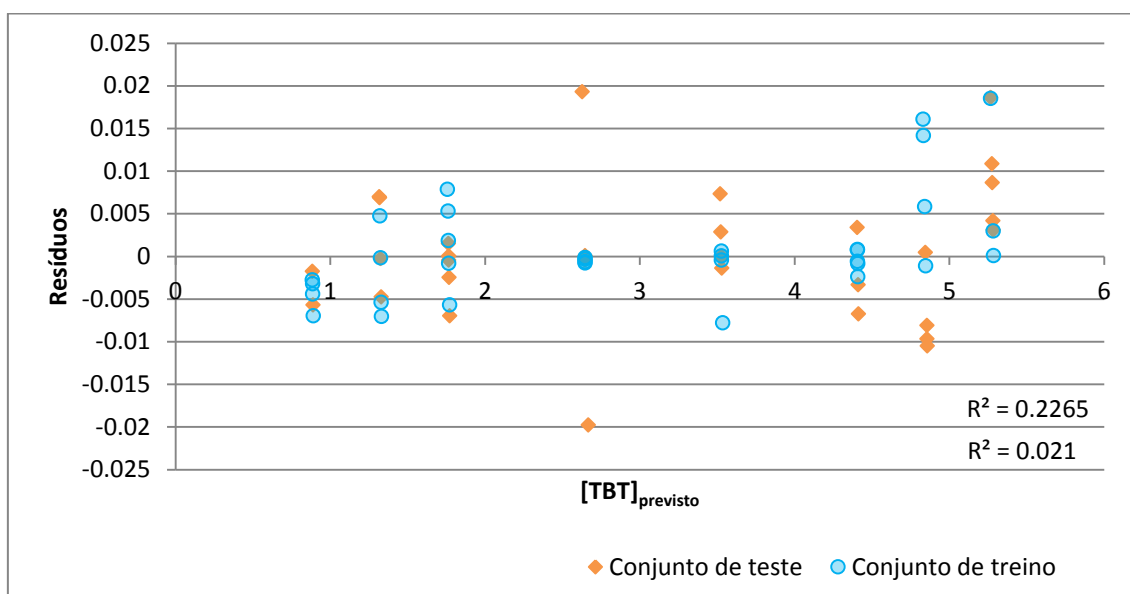


**Figura V.29** – Valores previstos vs valores experimentais da concentração de TBT em água do porto de Sesimbra para o conjunto de teste.

Tal como foi referido anteriormente, os valores de *bias* parecem mostrar que o modelo seleccionado não apresenta tendência para sobrestimar ou subestimar a variável de saída. Nas Figura V.30 e Figura V.31 representou-se o erro em função dos valores previstos pelo modelo para a concentração de TBT, tanto para o conjunto de treino como para o conjunto de teste.



**Figura V.30** – Representação gráfica dos resíduos em função dos valores previstos para a concentração de TBT em água Milli-Q para os conjuntos de treino e de teste.



**Figura V.31** – Representação gráfica dos resíduos em função dos valores previstos para a concentração de TBT em água salgada para os conjuntos de treino e de teste.

É claro pela análise de ambas as figuras e pelos coeficientes de correlação que nelas se apresentam que os valores se distribuem aleatoriamente de ambos os lados do eixo dos xx e que são independentes do valor da variável de saída tanto no conjunto de treino como no conjunto de teste. De acordo com Singh e colaboradores [Singh et al., 2009] estes resultados confirmam mais uma vez a

ideia de que ambas as RNAs apresentam um elevado desempenho na previsão da concentração de TBT nas matrizes estudadas.

Tendo em vista validar os modelos apresentados foram obtidos novos voltamogramas, nas condições voltamétricas definidas na Tabela V.2., para diferentes concentrações de TBT e diferentes tempos de deposição, pertencentes aos intervalos estudados.

Forneceram-se ao modelo as variáveis de entrada (tempo de deposição, posição do pico, altura do pico, área do pico, largura a meia altura e derivada) e comparou-se as concentrações de TBT obtidas pela RNA, para cada solução, com os valores conhecidos (Tabela V.7.).

**Tabela V.7. – Resumo dos valores de concentração previstos para um conjunto de dados de teste, utilizando a RNA seleccionada para amostras de água salgada.**

$t_{\text{dep}}$ (s)	[TBT] <sub>real</sub> ( $\mu\text{M}$ )	[TBT] <sub>prevista</sub> ( $\mu\text{M}$ )	% Recuperação	Erro
0	2,206	2,003	90,77	0,2036
5	2,206	1,938	87,85	0,2682
10	2,206	2,180	98,78	0,02692
15	2,206	1,988	90,11	0,2183
0	3,087	2,899	93,89	0,1887
5	3,087	2,985	96,69	0,1023
10	3,087	2,938	95,17	0,1492
15	3,087	2,756	89,26	0,315
0	3,968	4,166	104,99	-0,1982
5	3,968	4,064	102,42	-0,09608
10	3,968	3,910	98,55	0,05767
15	3,968	4,331	109,17	-0,3637

Pela análise da Tabela V.7. verifica-se que as percentagens de recuperação são bastante elevadas, quase sempre superiores a 90%. Verifica-se também que o módulo do erro associado aos valores previstos é sempre inferior  $0,5 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ .

### V.7. Análise de Sensibilidade dos Modelos

De um modo geral, pretende-se concentrar os esforços na aquisição dos dados referentes às variáveis que mais contribuem para a acuidade do modelo. A análise de sensibilidade é um procedimento que permite analisar o efeito das variações nas entradas sobre as variáveis de saída, através do cálculo da importância relativa de cada uma das variáveis de entrada.

A importância das variáveis de entrada pode ser feita, por exemplo, com base nos pesos das conexões entre as várias camadas que constituem a rede [Lee et al., 2003], ou com base numa análise de gradiente [Kewley et al., 2000]. Neste trabalho, contudo, optou-se pela análise de sensibilidade mais comumente utilizada e que consiste na determinação da variância produzida na saída ( $V_x$ ) quando todas as variáveis de entrada são mantidas no seu valor médio excepto uma, que varia ao longo da sua escala de valores [Kewley et al., 2000].

$$V_x = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{Y}_i - \bar{\hat{Y}})^2}{N - 1}$$

**Equação V.2.**

onde  $\hat{Y}_i$  denota o valor da saída obtido com todas as variáveis de entrada mantidas no seu valor médio excepto a variável  $x_i$  e  $\bar{\hat{Y}}$  denota o valor da saída obtido com todas as variáveis de entrada mantidas no seu valor médio, incluindo a variável  $x$ .

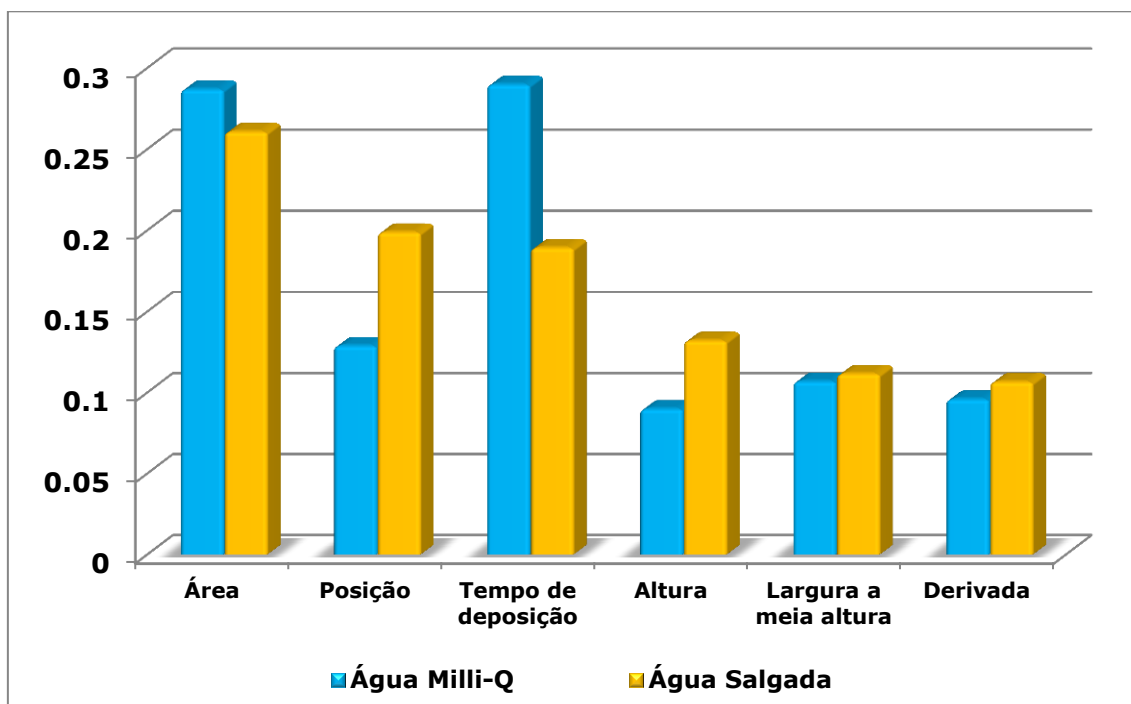
A importância relativa ( $IR_x$ ) das variáveis utilizadas pelo modelo é dada pelo quociente entre a variância produzida na saída pela variável  $x$  e o somatório das variâncias produzidas na saída por todas as variáveis de entrada:

$$IR_x = \frac{V_x}{\sum_j V_{xj}}$$

**Equação V.3.**

Na Figura V.32 apresenta-se a importância relativa das variáveis de entrada para os modelos apresentados anteriormente. A análise do gráfico apresentado na Figura V.32 mostra que a área do pico é a variável mais importante para o modelo referente à água salgada, secundada pela posição do pico e pelo tempo de

deposição. Para o modelo relativo à água Milli-Q as variáveis área do pico e tempo de deposição têm uma importância muito semelhante, secundadas pela posição do pico. Em ambos os modelos a importância relativa das três variáveis referidas é cerca de 70%. Estes resultados mostram, tal como foi destacado no ponto V.3.1, a impossibilidade de se estabelecer uma relação linear entre a concentração de TBT e qualquer uma das grandezas que caracterizam os picos voltamétricos.



**Figura V.32** – A importância relativa das variáveis de entrada para os modelos de previsão da concentração de TBT.





## Capítulo VI

*"Uma mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

### **Conclusões Finais e Perspectivas Futuras**

O estudo voltamétrico do TBT, sob as condições que, após determinação experimental, potenciam a sua detecção, mostra que, tal como já era anteriormente reportado na literatura a nível internacional, o TBT apresenta um comportamento electroquímico altamente complexo, não sendo possível quantificá-lo através dos métodos classicamente utilizados para outras espécies. No entanto, quando se constrói uma base de dados com os valores que caracterizam os picos de intensidade de corrente, nomeadamente posição, altura, área, largura de meia altura e derivada do pico e se aplica a essa mesma base de dados, sistemas provenientes da área da Inteligência Artificial, nomeadamente redes neuronais artificiais, verifica-se que estes novos sistemas permitem obter respostas muito próximas da realidade, com erros relativamente baixos para a gama de concentrações estudada.

No que concerne ao comportamento electroquímico do TBT verificou-se que:

- O TBT apresenta um comportamento electroquímico altamente complexo e que se altera em função de uma série de variáveis;
- O tampão fosfato é um electrólito de suporte que possibilita e potencia a oxidação do TBT, não apresentando qualquer resposta no intervalo de diferenças de potencial onde o TBT se oxida;
- A temperatura influencia o comportamento electroquímico do TBT devendo, em trabalhos futuros, efectuar-se um estudo acerca da influência da temperatura no comportamento electroquímico, mais concretamente nas características dos picos voltamétricos;
- As condições voltamétricas influenciam de uma forma preponderante a oxidação do TBT, nomeadamente a frequência, o tempo de equilíbrio, o tempo de deposição e a amplitude;

Esta técnica apresenta logo à partida uma limitação que se prende com o facto de o limite de detecção inferior ser relativamente elevado uma vez que não se conseguem obter voltamogramas analisáveis para concentrações inferiores a  $8,83 \times 10^{-4} \text{ mmol.dm}^{-3}$ .

Os resultados tratados ao longo de todo o trabalho estão relacionados apenas com amostras não-biológicas, mais concretamente com amostras de água salgada, recolhidas no porto de Sesimbra e posteriormente dopadas com concentrações conhecidas de TBT. Foram realizadas análises em amostras biológicas, nomeadamente em amostras de urina de rato dopadas com TBT, mas os resultados obtidos não foram conclusivos.

Durante e após a execução deste trabalho levantaram-se algumas questões de elevado interesse e que não foram possíveis de estudar, mas que se consideram preponderantes na percepção do comportamento electroquímico do TBT, nomeadamente um estudo do efeito da temperatura, pois verificaram-se algumas oscilações nos picos em dias em que a temperatura ambiente era diferente e o laboratório não estava climatizado.

Há também a necessidade de aplicar esta técnica, de uma forma mais exaustiva, a amostras de natureza biológica, de modo a inferir sobre a aplicabilidade da mesma.

Apesar de se ter utilizado uma amostra real de uma água recolhida num porto marítimo, aparentemente esta não apresentava picos de oxidação na zona onde aparecem os picos do TBT. No entanto, uma vez que se conhecem espécies que se oxidam a potenciais próximos daquele onde se detecta o TBT, é também importante efectuar um estudo da aplicabilidade desta técnica a amostras que estejam contaminadas não só com TBT, mas também com essas outras espécies, que podem encobrir a resposta que pertence exclusivamente ao TBT ou até mesmo interferir com ela, potenciando-a ou inibindo-a.

Na literatura encontram-se outros sensores voltamétricos, nomeadamente eléctrodos de nanotubos de carbono, que devem ser testados, num estudo futuro, para a caracterização electroquímica do TBT, devendo ser utilizados como eléctrodos de trabalho em substituição do eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Além deste outros podem e devem ser também testados. Não se encontra na literatura nenhuma referência a nenhum eléctrodo que isoladamente e fazendo uso de técnicas convencionais consiga caracterizar electroquimicamente o TBT mas terá interesse analítico aliar esses resultados a técnicas oriundas da quimiometria,

nomeadamente da descoberta de conhecimento em bases de dados, e avaliar a percentagem de recuperação que estas técnicas conseguem proporcionar.

Em suma, as técnicas electroquímicas, nomeadamente a voltametria de onde quadrada, e as técnicas de descoberta de conhecimento em bases de dados, nomeadamente as redes neuronais artificiais, apresentam-se como aliados fortes na determinação e quantificação de espécies organoestanhosas. Não se pode concluir já que estas duas técnicas combinadas podem substituir outras actualmente utilizadas e certificadas mas acredita-se que, com mais alguns estudos futuros, a médio prazo, se possam aplicar estas técnicas a este sistema e, quem sabe, também a outros sistemas mais complexos.



## Referências Bibliográficas

- [Akatsuka et al., 1959] Akatsuka, K., Miyazawa, J., Igarashi, I., Morishita, M., Handa, A., Kawame, N., Iwamoto, I., Morito, F., Murayama, K., Nakano, S., Yanagibashi, H., Nagasaki, T., Kotani, Y., Matsutani, W., Fukuda, I. & Iyo, T., Experimental studies on disturbance of sense of smell due to butyltin compounds. *Journal Tokyo Medical College*, 17: 1393-1402, 1959.
- [Aleixo, 2003] Aleixo, L. M., Voltametria: Conceitos e Técnicas, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Brasil, 2003.
- [Alzieu, 1981] Alzieu, C. P., Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchylicoles. *Institut scientifique et technique des Pêches maritimes*, 84, 1981.
- [Alzieu et Heral, 1984] Alzieu, C. P. & Heral, M., Ecotoxicological effects of organotin compounds on oyster culture. *Ecotoxicol. Test. Mar. Environ.*, 2: 187-196, 1984.
- [Andrienko et Andrienko, 1998] Andrienko, G. L. & Andrienko, N. V., Knowledge Extraction from Spatially Referenced Databases: a Project of an Integrated Environment. *Varenius Workshop on Status and Trends in Spatial Analysis*, 1998.
- [Azoff, 1994] Azoff, E., Neural Networks Time Series Forecasting of Financial Markets. John Wiley & Sons, USA, 1994.
- [Bard & Faulkner, 2001] Bard, A. J. & Faulkner, L. R., Electrochemical methods fundamentals and applications. John Wiley & Sons, New York, 2001.
- [Barek et al., 2001] Barek, J., Foog, A. G., Muck, A. & Zima, J., J. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2001.
- [Best, 1999] Best, G., Environmental Pollution Studies. 1st, Liverpool University Press, Liverpool, 1999.
- [Bhattacharyya et al., 2012] Bhattacharyya, R., Tudu, B., Das, S. C., Bhattacharyya, N., Bandyopadhyay, R. & Pramanik, P., Classification of black tea liquor using cyclic voltammetry. *Journal of Food Engineering*, 10.1016/j.jfoodeng.2011.09.026: 2012.
- [Bond et al., 1995] Bond, A., Turoczy, N. J. & Carter, R. J., The Electrochemistry of Monobutyltin and mixtures of butyltin compounds at mercury electrodes in aqueous media. *Anal. Chem. Acta*, 310: 109-119, 1995.
- [Bond, 1994] Bond, A. M., Turoczy, N. J. & Carter, R. J., The Electrochemistry of Tributyltin at Mercury Electrodes in Aqueous Media. *Journal of Electroanal. Chem.*, 365: 125, 1994.
- [Bond & McLachlan, 1988] Bond, M. & McLachlan, N. M., Polarographic studies on tributyltin oxide in dichloromethane and tetrahydrofuran with application to antifouling paint. *Anal. Chem. Acta*, 204: 151-159, 1988.
- [Boorman & Plum, 1975] Boorman, A. & Plum, H., Industrial manufacture and use of organotin compounds. Bergkamen, 1975.
- [Booth & Fleet, 1970] Booth, M. D. & Fleet, B., Electrochemical behavior of triphenyltin compounds and their determination at submicrogram levels by anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.*, 42: 825-831, 1970.
- [Bose & Liang, 1996] Bose, N. & Liang, P., Neural Networks Fundamentals with Graphs, Algorithms and Applications. McGraw-Hill, USA, 1996.
- [Botica et al, 2003] Botica, N., Santos, M. & Lemos, F., Modelo preditivo de patrimônio arqueológico. Em Eds., DSI - Engenharia da Programação e dos Sistemas Informáticos, Vol. pp. Porto, 2003.
- [Bramer, 2007] Bramer, M., Principles of Data Mining. Springer-Verlag, Londres, U.K., 2007.

- [Breiman et al., 1984] Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A. & Stone, C. J., Classification and Regression Trees. Chapman & Hall / CRC Press, Boca Raton, USA, 1984.
- [Brett & Oliveira-Brett, 1993] Brett, C. M. A. & Oliveira-Brett, A. M., Electrochemistry: Principles, Methods and Applications. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [Bryson, 2003] Bryson, B., A Short history of Nearly Everything. Random House, Inc., New York, 2003.
- [Cabanillas et al., 2007] Cabanillas, A. G., Cáceres, M. I. R., Cañas, M. A. M., Burguillos, J. M. O. & Diaz, T. G., Square wave adsorptive stripping voltametric determination of the mixture of nalidixic acid and its main metabolite (7-hydroxymethylnalidixic acid) by multivariate methods and artificial neural network. *Talanta*, 72: 932-940, 2007.
- [Carvalho, 2008] Carvalho, J. R. d., Otimização da Metodologia de Determinação de Molibdênio em Solos e Plantas por Voltametria de Onda Quadrada com Redissolução Catódica Adsorptiva, Minas Gerais - Brasil, 2008.
- [Centineo et al., 2007] Centineo, G., Rodríguez-González, P. & Alonso, J. I. G., Determination of Butyltin Compounds in Environmental Samples by Isotope Dilution GC-MS. *Agilent Technologies*, 6, 2007.
- [Chambers, 2001] Chambers, L., The Practical Handbook of Genetic Algorithms. 2.<sup>a</sup> edição, Chapman & Hall/CRC, EUA, 2001.
- [Chenard & Caissie, 2008] Chenard, J. F. & Caissie, D., Stream temperature modelling using artificial neural networks: application on Catamaran Brook. *Hydrological Processes*, 22: 3361-3372, 2008.
- [Cheng & Titterton, 1994] Cheng, B. & Titterton, D. M., Neural networks: a review from a statistical perspective. *Statistical Science*, 9: 2-30, 1994.
- [Clementine, 2007] Clementine, Clementine 12.0 User's Guide. Integral Solution Limited, Chicago, 2007.
- [Cortez, 2002] Cortez, P., Modelos Inspirados na Natureza para a Previsão de Séries Temporais, Tese de Doutorado, Departamento de Informática, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2002.
- [Cortez, 2004] Cortez, P., Aprendizagem e Avaliação de Modelos – Apontamentos Pedagógicos. Departamento de Sistemas de Informação, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal. 2004.
- [Davies et al., 1984] Davies, R. J., Fletcher, R. L. & Furtado, S. E. J., The effects of tributyltin compounds on spore development in the green alga *Enteromorpha intestinalis*. Em Eds., *Proceedings of 6th International Congress on Marine Corrosion and Fouling*, 557-565, Athens. 1984.
- [Dobson & Cabridenc, 1990] Dobson, S. & Cabridenc, R., Tributyltin Compounds. Environmental Health Criteria, International Programme on Chemical Safety, Geneva, 1990.
- [Emmert-Streib & Dehmer, 2008] Emmert-Streib, F. & Dehmer, M., Analysis of Microarray Data. Wiley-VCH, Alemanha, 2008.
- [Ensafi et al., 2002] Ensafi, A. A., Khayamian, T. & Atabati, M., Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and copper by adsorption cathodic differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network. *Talanta*, 57: 785-793, 2002.
- [Ensafi et al., 2006] Ensafi, A. A., Khayamian, T., Benvidi, A. & Mirmomtaz, E., Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. *Anal. Chem. Acta*, 561: 225-232, 2006.
- [EPA, 2003] Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria for Tributyltin. EPA - United States Environmental Protection Agency. 2003.
- [Esteban et al., 2006] Esteban, M., Ariño, C. & Díaz-Cruz, J. M., Chemometrics in Electroanalytical Chemistry. *Anal. Chem.*, 36: 295-313, 2006.

- [Fayyad et al., 1996a] Fayyad, U., Piatetsky-Shapiro, G. & Smyth, P., The KDD process for extracting useful knowledge from volumes of data. *Communications of the ACM*, 39: 27-34, 1996a.
- [Fayyad et al., 1996b] Fayyad, U., Piatetsky-Shapiro, G., Smith, P. & Uthurusamy, R., *Advances in Knowledge Discovery and Data Mining*. AAAI Press/MIT Press, Massachusetts, USA, 1996b.
- [Fent, 1989] Fent, K., Organotin speciation in municipal wastewater and sewage sludge: Ecotoxicological consequences. *Mar. environ. Res.*, 28: 477-483, 1989.
- [Fent et al., 1989] Fent, K., Fassbind, R. & Siegrist, H., Organotins in a municipal wastewater treatment plant. Em Eds., *Proceedings of Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology*, 17-19, The Technical University of Denmark, Laboratory of Environmental Sciences and Ecology, Copenhagen. 1989.
- [Ferro, 2002] Ferro, J. M. A., Contributo para o estabelecimento de um método para análise do TBT em urina de rato wistar, Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade de Évora, Évora, Portugal, 2002.
- [Floch et al., 1964] Floch, H., Deschiens, R. & Floch, R., Sur les propriétés molluscicides de l'oxide et de l'acétate de tributylétain (prophylaxie des bilharzioses). *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 57: 454-465, 1964.
- [Flood & Kartam, 1994] Flood, I. & Kartam, N., Neural network in civil engineering: I. Principles and understanding. *Journal of Computational in Civil Engineering*, 8: 131-148, 1994.
- [Galushkin, 2007] Galushkin, A., *Neural Networks Theory*. Springer, Russia, 2007.
- [Gao & Roy, 1994] Gao, R. & Roy, D., Effects of diffusio-limited mass transfer on metal underpotential deposition voltammograms. *Journal of Applied Electrochemistry*, 24: 1276-1278, 1994.
- [Gasteiger, 2006] Gasteiger, J., The central role of chemoinformatics. *Chem. and Intell. Lab. Sys.*, 82: 200-209, 2006.
- [Ghasemi-Varnamkhasti et al., 2012] Ghasemi-Varnamkhasti, M., Rodríguez-Méndez, M. L., Mohtasebi, S. S., Apetrei, C., Lozano, J., Ahmadi, H., Razavi, S. H. & Antonio de Saja, J., Monitoring the aging of beers using a bioelectronic tongue. *Food Control*, DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.10.020, 2012.
- [Gopalan & Sivaselvan, 2009] Gopalan, N. P. & Sivaselvan, B., *Data Mining: Techniques and Trends*. PHI Learning, New Delhi, India, 2009.
- [Govindaraju & Rao, 2010] Govindaraju, R. S. & Rao, A. R., *Artificial Neural Networks in Hydrology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, 2010.
- [Grovhoug et al., 1986] Grovhoug, J. G., Seligman, P. F., Vafa, G. & Fransham, R. L., Baseline measurements of butyltin in U.S. harbors and estuaries. Em Eds., *Proceedings of the Organotin Symposium, Proceedings of Oceans '86 Conference*, 1283-1288, The Institute of Electrical and Electronics Engineers, New York. 1986.
- [Hall et al., 2009] Hall, M., Frank, E., Holmes, G., Pfahringer, B., Reutemann, P. & Witten, I. H., The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Exploration*, 11: 10-18, 2009.
- [Han & Kamber, 2006] Han, J. & Kamber, M., *Data Mining: Concepts and Techniques*. 2ª Ed., Morgan Kauffmann Publishers, San Francisco, U.S.A., 2006.
- [Harrison, 1998] Harrison, T. H., *Intranet Data Warehouse*. Berkeley, São Paulo, 1998.

- [Hasebe et al., 1982] Hasebe, K., Yamamoto, Y. & Kambara, T., Differential pulse-polarographic determination of organotin compounds coated on fishing nets. *Fresenius Journal Anal. Chem.*, 310: 234-238, 1982.
- [Hastie et al., 2001] Hastie, T., Tibshirani, R. & Friedman, J., The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference and Prediction. Springer-Verlag, New York, USA, 2001.
- [Haykin, 2008] Haykin, S., Neural Networks and Learning Machines. 3<sup>a</sup> Ed., Prentice-Hall, New York, USA, 2008.
- [Heijst, 1999] Heijst, A. N. P. v., Tributyltin Compounds. International Programme on Chemical Safety, Dinamarca, 1999.
- [Hill, 2004] Hill, M. K., Understanding Environmental Pollution. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, 2004.
- [Hornik et al., 1989] Hornik, K., Stinchcombe, M. & White, H., Multilayer feed-forward networks are universal approximators. *Neural Networks*, 2: 359-366, 1989.
- [Jensen e Cheng, 1987] Jensen, A. & Cheng, Z., Total tin and organotin in seawater from pleasure craft marinas along Danish coast of the Sound. Em Marine Pollution Laboratory Eds., Proceedings of the 15th Conference of Baltic Oceanographers (CBO), *Proceedings of* 289-298, Copenhagen. 1987.
- [Jordan, 1995] Jordan, M., Why the logistic function? A tutorial discussion on probabilities and neural networks. MIT, 1995.
- [Kenis & Zirino, 1983] Kenis, P. & Zirino, A., Quantitative measurement of tributyltin oxide in sea water by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem. Acta*, 149: 157-166, 1983.
- [Kewley et al., 2000] Kewley, R., Embrechts, M. & Breneman, C., Data strip mining for the virtual design of pharmaceuticals with neural networks. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 11: 668-679, 2000.
- [Kim et al, 2011] Kim, N. S., Shim, H. J., Yim, U. H., a, S. Y., An, J. G. & Shin, K. H., Three decades of TBT contamination in sediments around a large scale shipyard. *Journal of Hazardous Materials*, 192: 634-642, 2011.
- [Kissinger & Heineman, 1996] Kissinger, P. T. & Heineman, W. R., Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry. 2.<sup>nd</sup>, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [Larose, 2006] Larose, D. T., Data Mining Methods and Models. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, U.S.A., 2006.
- [Lee et al., 2003] Lee, J. H., Huang, Y., Dickman, M. & Jayawardena, A. W., Neural network modelling of coastal algal blooms. *Ecological Modelling*, 159: 179-210, 2003.
- [Maguire, 1984] Maguire, R. J., Butyltin compounds and inorganic tin in sediments in Ontario. *Environmental Science & Technology*, 18: 291-294, 1984.
- [Maguire et Tkacz, 1987] Maguire, R. J. & Tkacz, R. J., Concentration of tributyltin in the microlayer of natural waters. *Water Pollut. Res. J. Can.*, 22: 227-233, 1987.
- [Maguire et al, 1985] Maguire, R. J., Tkacz, R. J. & Sartor, D. L., Butyltin species and inorganic tin in water and sediment of the Detroit and St. Clair rivers. *J. Great Lakes Res.*, 11: 320-327, 1985.
- [Maguire et al, 1986] Maguire, R. J., Tkacz, R. J., Chau, Y. K., Bengert, G. A. & Wong, P. T. S., Occurrence of organotin compounds in water and sediment in Canada. *Chemosphere*, 15: 253-274, 1986.
- [Maguire et al, 1982] Maguire, R. J., Chau, Y. K., Bengert, G. A., Hale, E. J., Wong, P. T. S. & Kramar, O., Occurrence of organotin compounds in Ontario lakes and rivers. *Environmental Science & Technology*, 16: 698-702, 1982.
- [Muller, 1987] Muller, M. D., Comprehensive trace level determination of organotin compounds in environmental samples using high-resolution gas



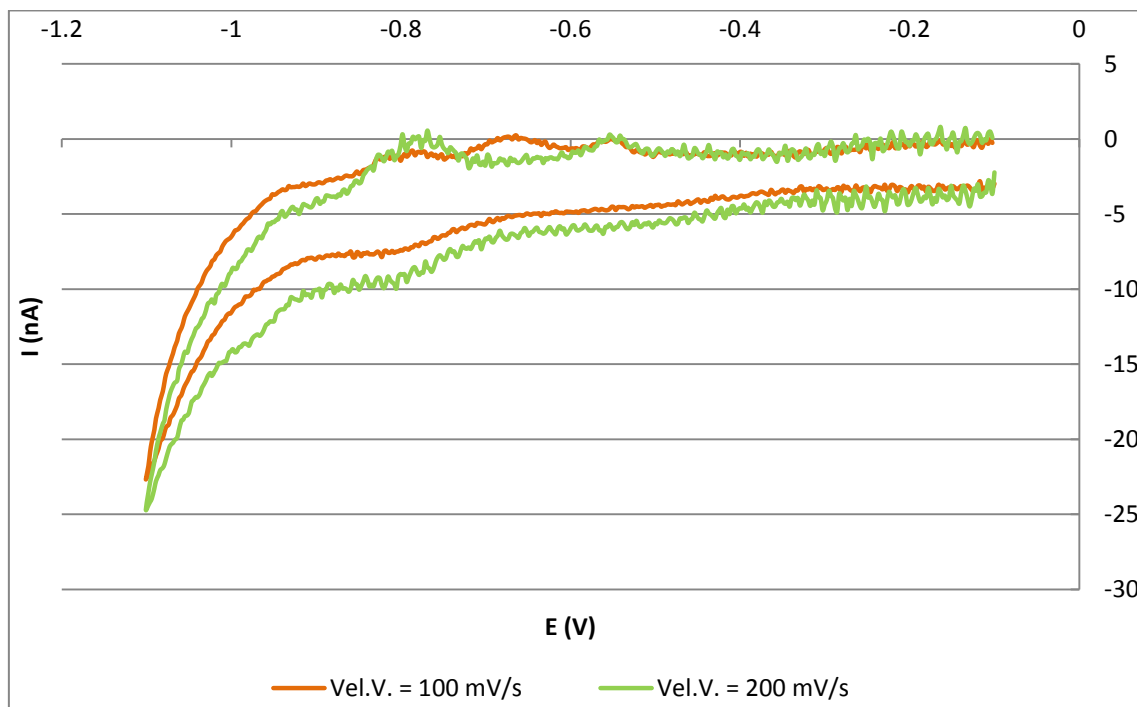
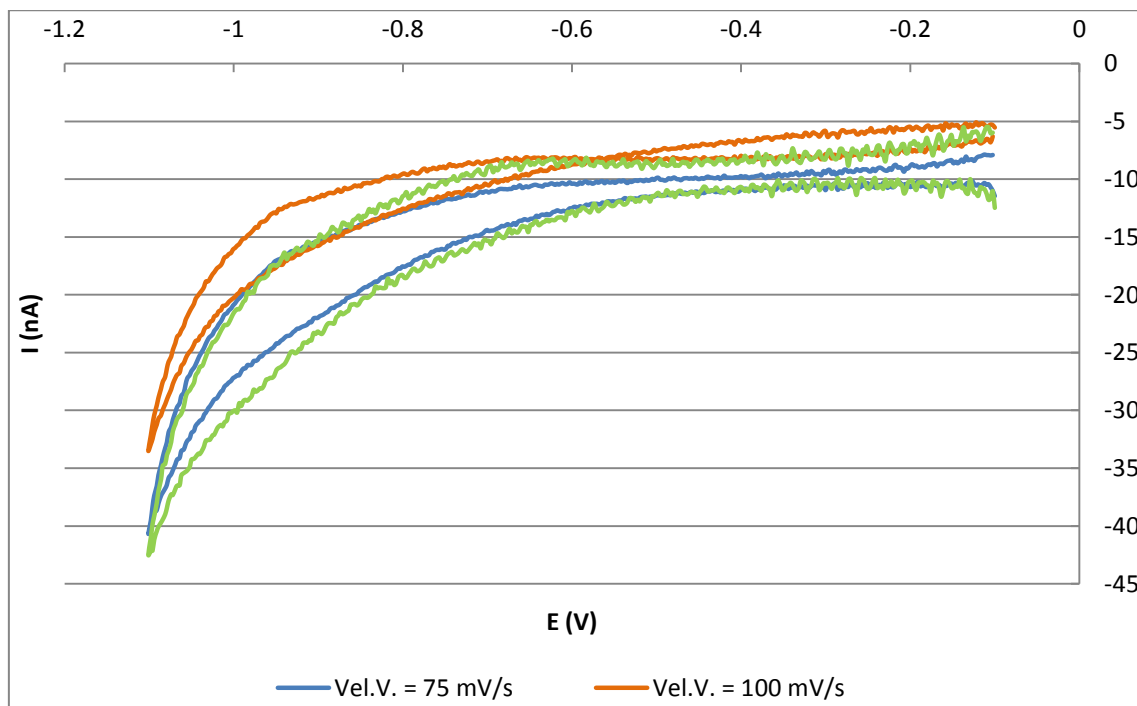
- chromatography with flame photometric detection. *Anal. Chem.*, 59: 617-623, 1987.
- [Ni&Kokot, 2008] Ni, Y. & Kokot, S., Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis? *Anal. Chem. Acta*, 626: 130-146, 2008.
- [Nisbet et al., 2009] Nisbet, R., Elder, J. & Miner, G., Handbook of Statistical Analysis & Data Mining Applications. Academic Press, San Diego, USA, 2009.
- [Ochsenkuhn-Petropoulou et al, 1992] Ochsenkuhn-Petropoulou, M., Poulea, G. & Parissakis, G., Electrochemical speciation of organotin compounds in water and sediments. Application to sea water after ion-exchange separation. *Mikrochim. Acta*, 109: 93-99, 1992.
- [Ochsenkún, 2001] Ochsenkún, K., Ochsenkún-Petropoulou, M., Tsopelas, F. & Mendrinós, L., Different Behavior of Organotin Compounds by Anodic Stripping Voltammetry and their Quantification after Partial Ion Exchange Separation. *Mikrochim. Acta*, 136: 129-135, 2001.
- [Pacheco, 2004] Pacheco, W. F., Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina, Mestrado, Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- [Page, 1989] Page, D. S., An analytical method for butyltin species in shellfish. *Mar. Pollut. Bull.*, 20: 129-133, 1989.
- [Patterson, 1996] Patterson, D., Artificial Neural Networks - Theory and Application. Prentice Hall, New York, U.S.A., 1996.
- [Pyle, 1999] Pyle, D., Data Preparation for Data Mining. Morgan Kaufmann, San Francisco, USA, 1999.
- [Quevauviller, 1996] Quevauviller, P., Improvement of quality control of speciation analysis using hyphenated techniques A decade of progress within the European Community. *Journal of Chromatography A*, 750: 25-33, 1996.
- [RCPI et al., 2007] RCPI, CPCH, CPIT & CRC, Draft Decision Guidance Document for Tributyltin Compounds. United Nations Environment Programme, 2007.
- [Rich & Knight, 1991] Rich, E. & Knight, K., Artificial Intelligence. 2ª Ed., McGraw-Hill Inc., New York, U.S.A., 1991.
- [Rodrigues, 2002] Rodrigues, A. E. C., Desenvolvimento de um método Voltamétrico para a Avaliação do Crescimento Microbiano, Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2002.
- [Rojas, 1996] Rojas, R., Neural Networks - A Systematic Introduction. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha, 1996.
- [Santalla, 2008] Santalla, R. P., Especificação de Organoestânicos em Matrizes Ambientais por Extração Sortiva em Barra de Agitação e Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências, Lisboa, 2008.
- [Santos, 2001] Santos, M., PADRÃO - Um sistema de Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados Georeferenciadas, Tese de Doutorado, Universidade do Minho, 2001.
- [Santos & Azevedo, 2005] Santos, M. & Azevedo, C., Data Mining - Descoberta de Conhecimento em Base de Dados. FCA - Editora de Informática Lda, Lisboa, Portugal, 2005.
- [Santos et al., 1999] Santos, M., Amaral, L. & Pimenta, P., A descoberta de conhecimento em bases de dados geográficas através da explicitação semântica. Em Eds., *Proceedings of Congress and exhibition of latin america geo-processing users*, Salvador da Baía. 1999.
- [Santos et al., 2005] Santos, M. F., Cortez, P., Quintela, H., Neves, J., Vicente, H. & Arteiro, J., Ecological Mining - A Case Study on Dam Water Quality. Em A. Zanasi, C.A. Brebbia & N.F.F. Ebecken Eds., *Data Mining VI - Data Mining, Text Mining and their Business Applications*, WIT Transactions of Information

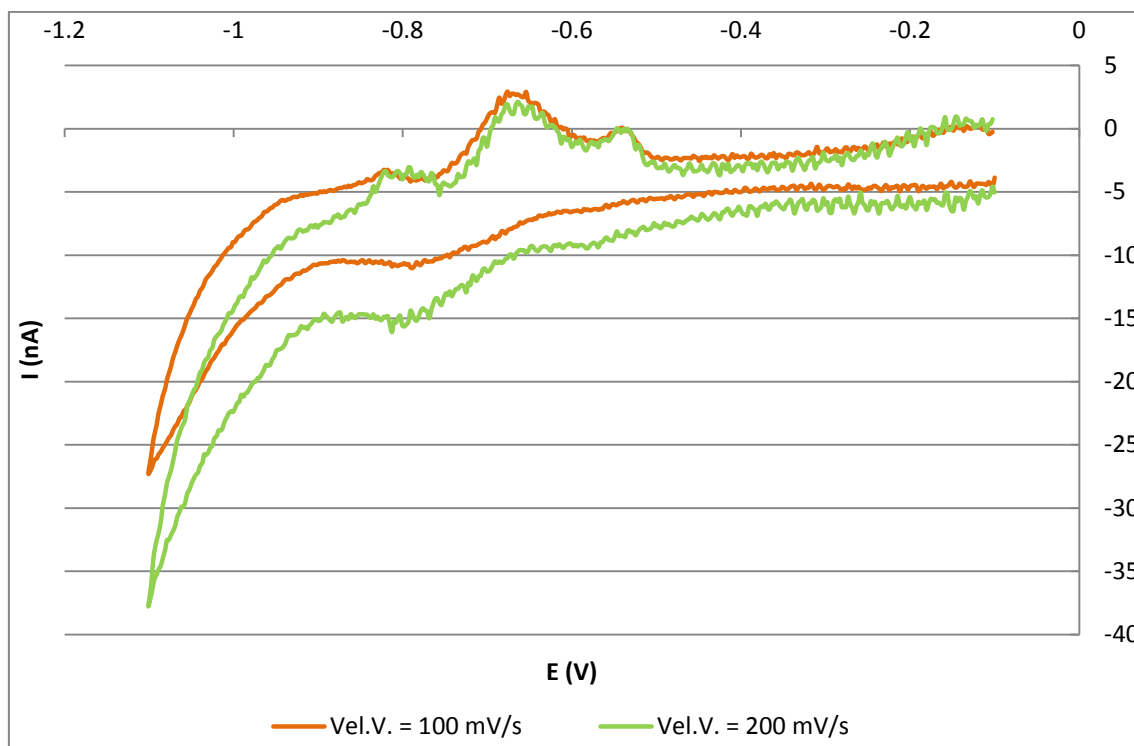
- and Communication Technologies, Vol. 35, pp. 523-531, WIT Press, Southampton, UK, 2005.
- [Schulze & Lechmann, 1994] Schulze, G. & Lechmann, C., Separation of mono-, di- and tributyltin compounds by isocratic ion-exchange liquid chromatography coupled with hydride-generation atomic absorption spectrometric determination. *Anal. Chem. Acta*, 288: 215-220, 1994.
- [Seligman et al, 1986] Seligman, P. F., Grovhoug, J. G. & Richter, K. E., Measurements in butyltins in San Diego Bay. Em The Institute of Electrical and Electronical Engineers Eds., Proceedings of the Organotin Symposium, *Proceedings of Oceans '86 Conference*, 1289-1296, New York. 1986.
- [Sharda & Rampal, 1996] Sharda, R. & Rampal, R., Neural Networks and Management Science/Operations Research: A Bibliographic Essay. Em Allen Kent & Carolyn M. Hall Eds., Encyclopedia of Library and Information Science, Vol. 61, Sup. 24, pp. 247-259, Marcel Dekker, New York, U.S.A., 1996.
- [Singh et al., 2009] Singh, K. P., Basant, A., Malik, A. & Jain, G., Artificial Neural Network Modelling of the River Water Quality - A case study. *Ecological Modeling*, 220: 888-895, 2009.
- [Sivananda & Deepa, 2008] Sivananda, S. N. & Deepa, S. N., Introduction to Genetic Algorithms. Springer, Berlin, Alemanha, 2008.
- [Skoog et al., 2007] Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R., Principles of Instrumental Analysis. 6.<sup>a</sup> edição, Brooks/Cole, Cengage Learning, Andover, Reino Unido, 2007.
- [Smaele et al., 1999] Smaele, T., Moens, L., Sandra, P. & Dams, R., Determination of organometallic compounds in surface water and sediment samples with SPME-CGC-ICPMS. *Mikrochim. Acta*, 130: 1999.
- [Soracco & Pope, 1983] Soracco, R. J. & Pope, D. H., Bacteriostatica and bacteriidal modes of action of bis (tributyltin) oxide on *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 48-57, 1983.
- [Souza et al., 2003] Souza, D., Machado, S. A. S. & Avaca, L. A., Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova*, 26: 81-89, 2003.
- [Stallard et al, 1987] Stallard, M., Hodge, V. & Goldberg, E. D., TBT in California coastal waters: Monitoring and assessment. *Environ. Monit. Assess.*, 9: 195-220, 1987.
- [Szpunar-Lobinska et al., 1995] Szpunar-Lobinska, J., Witte, C., Lobinski, R. & Adams, F. C., Separation techniques in speciation analysis for organometallic species. *Fresenius Journal Anal. Chem.*, 351: 351-377, 1995.
- [Teixeira, 2005] Teixeira, H. Q., Sistemas de Conhecimento Baseados em Data Mining: Aplicação à Análise da Estabilidade de Estruturas Metálicas, Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2005.
- [Thain, 1983] Thain, J. E., The acute toxicity of bis (tributyltin) oxide to the adults and larvae of some marine organisms. International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Copenhagen. 1983.
- [Torgo, 1999] Torgo, L. F., Inductive learning of tree-based regression models, Tese de Doutoramento, Universidade do Porto, Porto, 1999.
- [Torrecilla et al., 2007] Torrecilla, J., Mena, M., Yáñez-Sedeño, P. & Garcia, J., A Neural Network Approach based on gold-nanoparticle enzyme biosensor. *Journal of Chemometrics*, 22: 46-53, 2007.
- [Veelenturf, 1995] Veelenturf, L., Analysis and Applications of Artificial Neural Networks. Prentice Hall, United Kingdom, 1995.
- [Waldock, 1989] Waldock, M. J., Organotin concentrations in the Rivers Bure and Yare, Norfolk Broads. Essex, Burnham-on-Crouch. 1989.

- [Waldock & Miller, 1983] Waldock, M. J. & Miller, D., The determination of total and tributyl tin in seawater and oysters in areas of high pleasure craft activity. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*, 18, 1983.
- [Walker, 2009] Walker, C. H., Organic Pollutants, An Ecotoxicological Perspective. 2.<sup>o</sup> edition, CRC Press, Boca Raton, 2009.
- [Wang, 1988] Wang, J., Electroanalytical Techniques in clinical chemistry and laboratory medicine. VCH publisher, New York, USA, 1988.
- [Wang, 2006] Wang, J., Analytical Electrochemistry. 3.<sup>a</sup> edição, VCH publishers, New York, USA, 2006.
- [Webbe, 1963] Webbe, G., Laboratory tests of some new molluscicides (organotin compounds). World Health Organization, Geneva. 1963.
- [Wei et al., 2011] Wei, Z., Wang, J. & Ye, L., Classification and prediction of rice wines with different marked ages by using a voltammetric electronic tongue. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 4767-4773, 2011.
- [Weiss & Provost, 2001] Weiss, G. & Provost, F., The effect of class distribution on classifier learning: an empirical study. Technical Report ML-TR-44, Department of Computer Science, Rutgers University. 2001.
- [WHO/FAO, 1984] WHO/FAO, Bis (tributyltin) oxide. World Health Organization, Geneva. 1984.
- [Witten & Frank, 2005] Witten, I. H. & Frank, E., Data Mining - Practical Machine Learning Tools and Techniques. *Elsevier*, 2005.

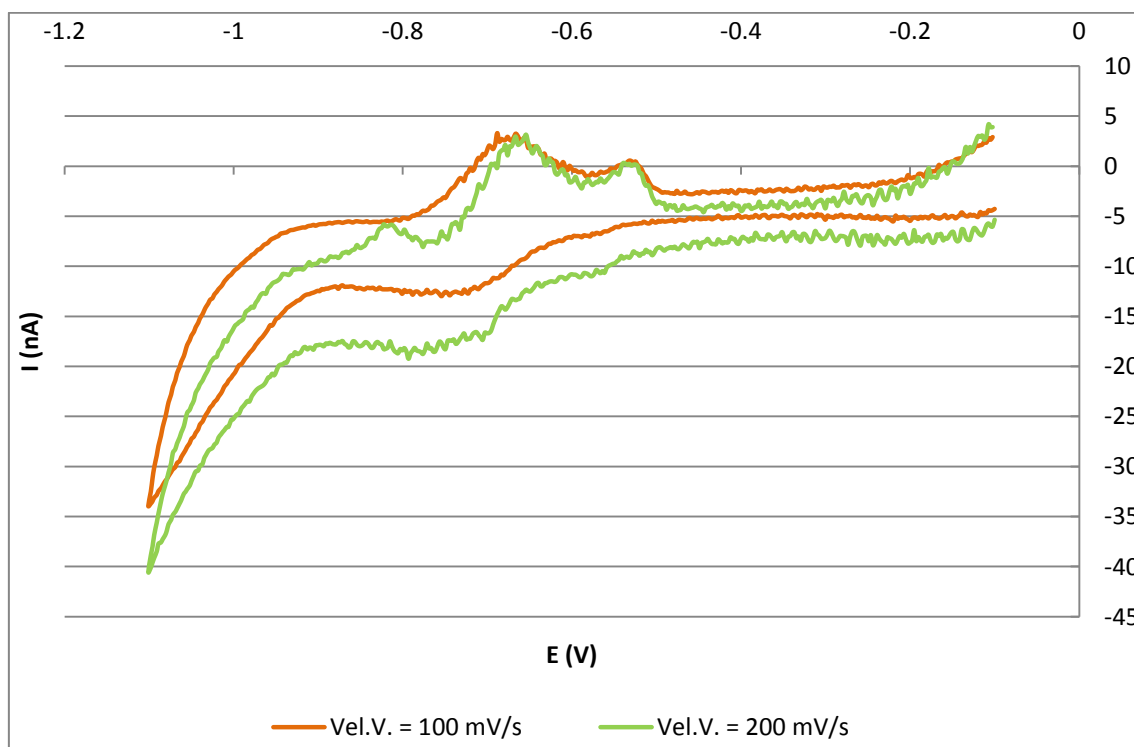


## Anexo I – Estudo do electrólito de suporte (HCl)

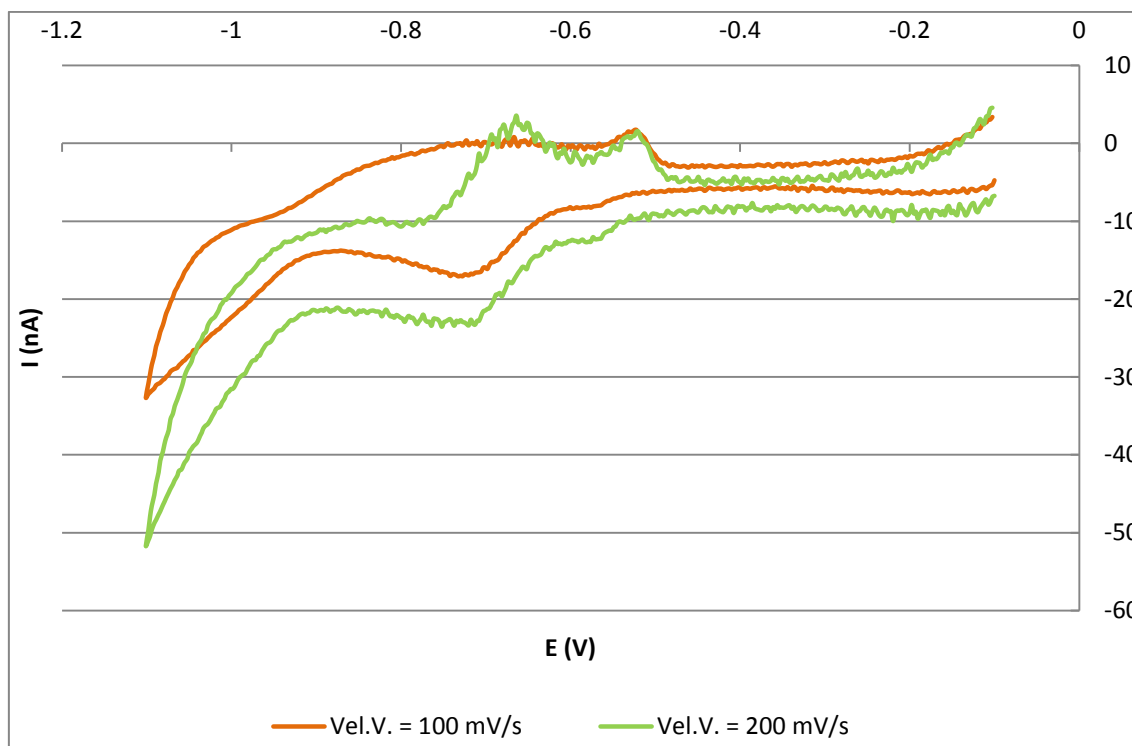




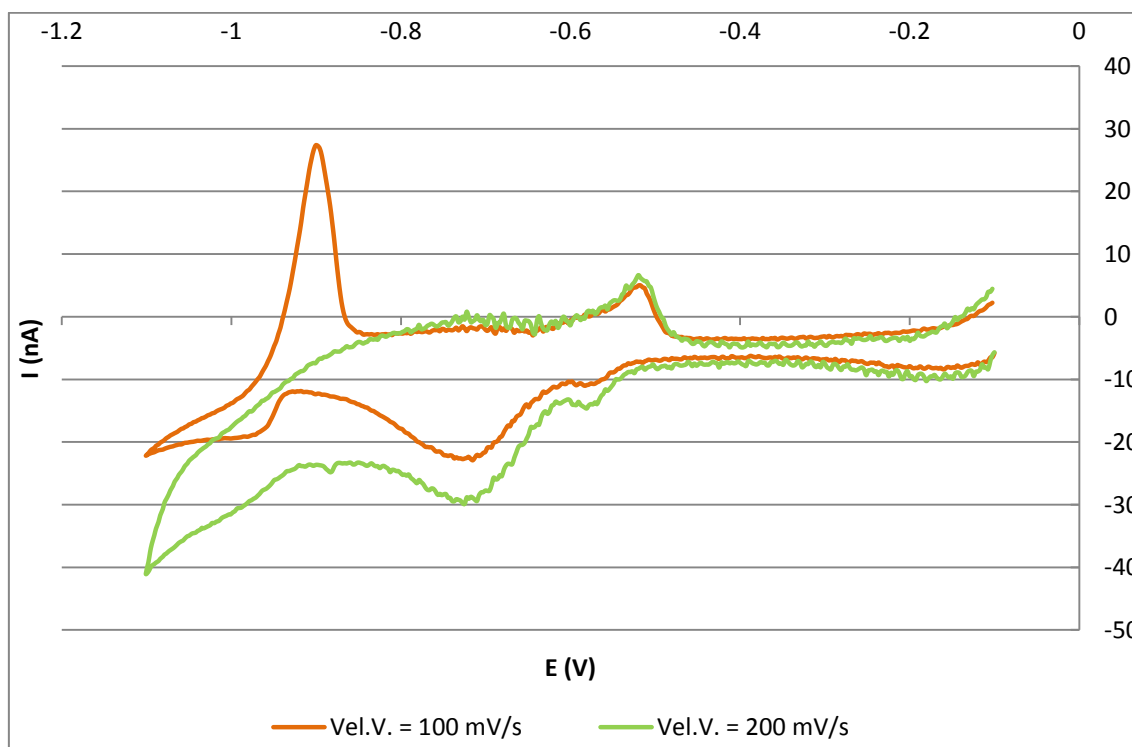
**Gráfico AI. 3.** – Voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial [-1,1; -0,1] V, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (HCl 0,01 mol.dm<sup>-3</sup>) e uma concentração de TBT igual a 17,61 µM. Estes voltamogramas foram obtidos com T<sub>eq</sub> = 5 s, pH natural e V.V. variável.



**Gráfico AI. 4.** – Voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial [-1,1; -0,1] V, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (HCl 0,01 mol.dm<sup>-3</sup>) e uma concentração de TBT igual a 26,35 µM. Estes voltamogramas foram obtidos com T<sub>eq</sub> = 5 s, pH natural e V.V. variável.



**Gráfico AI. 5.** – Voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial [-1,1; -0,1] V, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (HCl 0,01 mol.dm<sup>-3</sup>) e uma concentração de TBT igual a 35,05 µM. Estes voltamogramas foram obtidos com  $T_{eq}$  = 5 s, pH natural e V.V. variável.

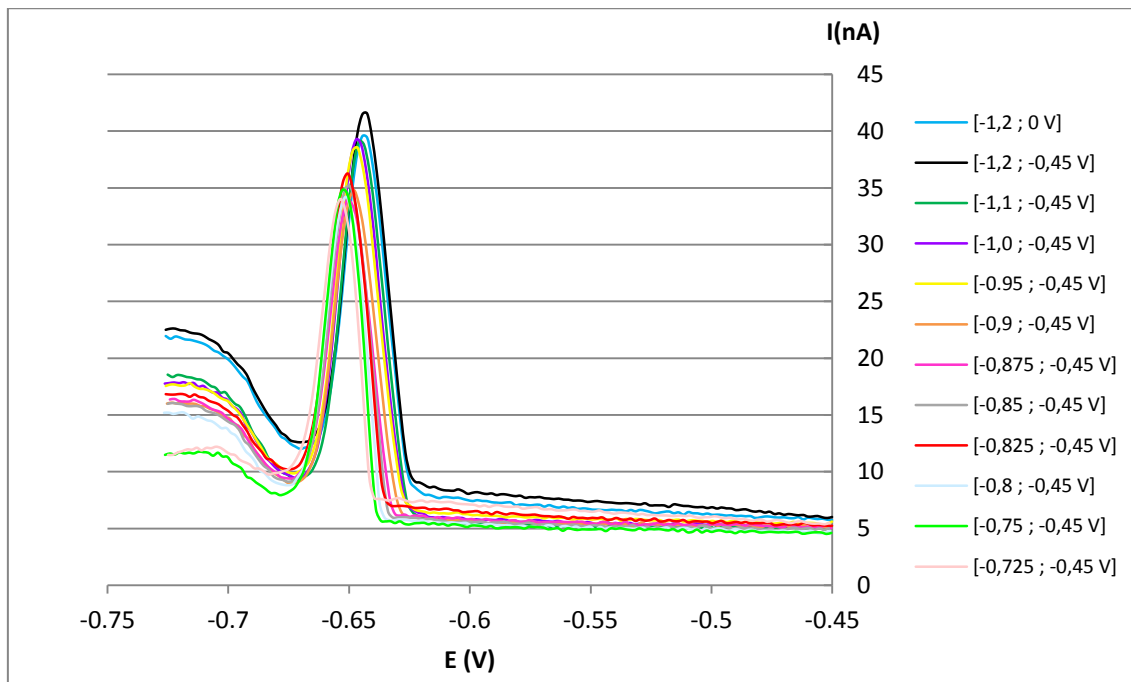


**Gráfico AI. 6.** – Voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial [-1,1; -0,1] V, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (HCl 0,01 mol.dm<sup>-3</sup>) e uma concentração de TBT igual a 52,32 µM. Estes voltamogramas foram obtidos com  $T_{eq}$  = 5 s, pH natural e V.V. variável.

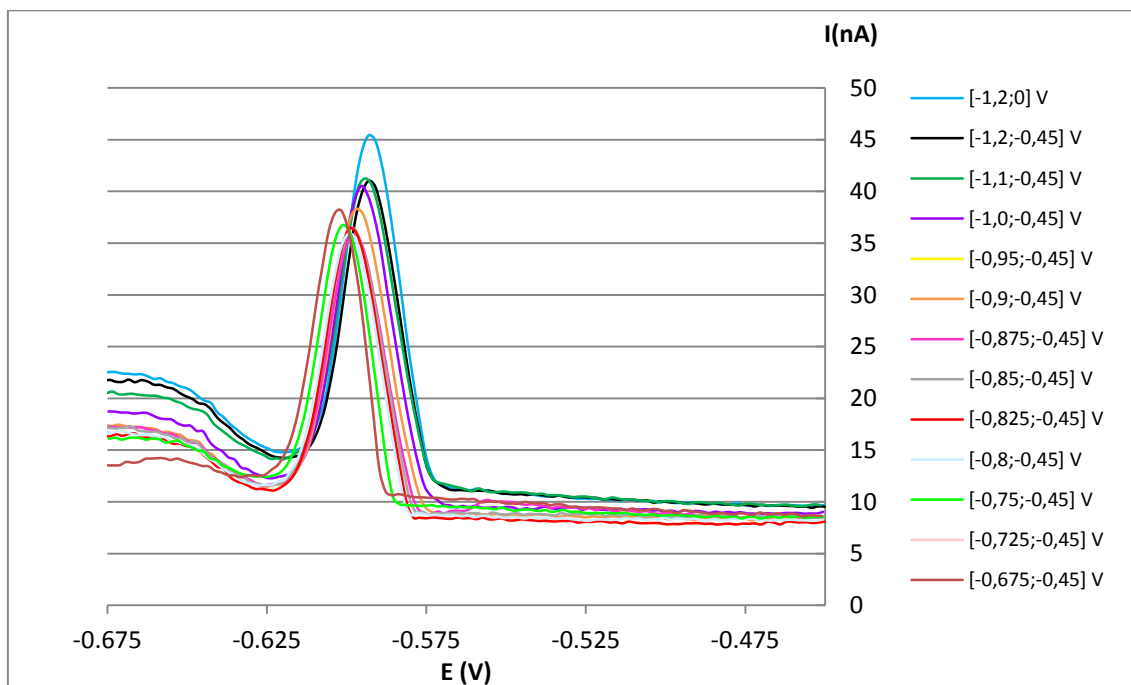




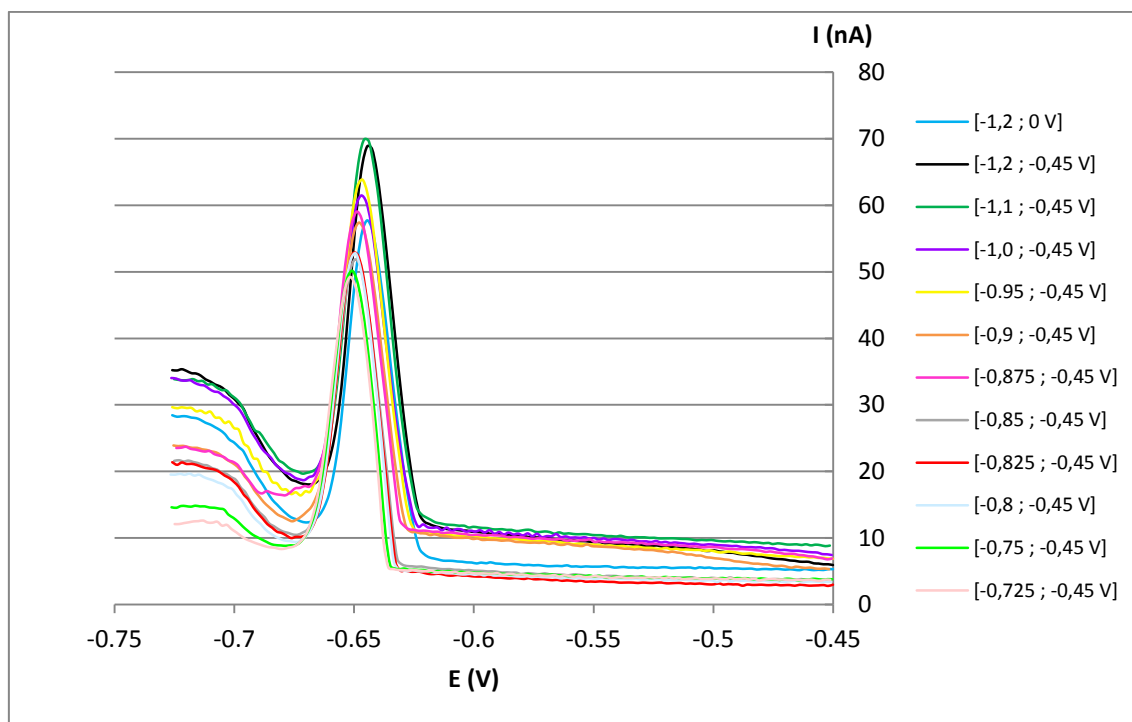
## Anexo II – Estudo do Potencial



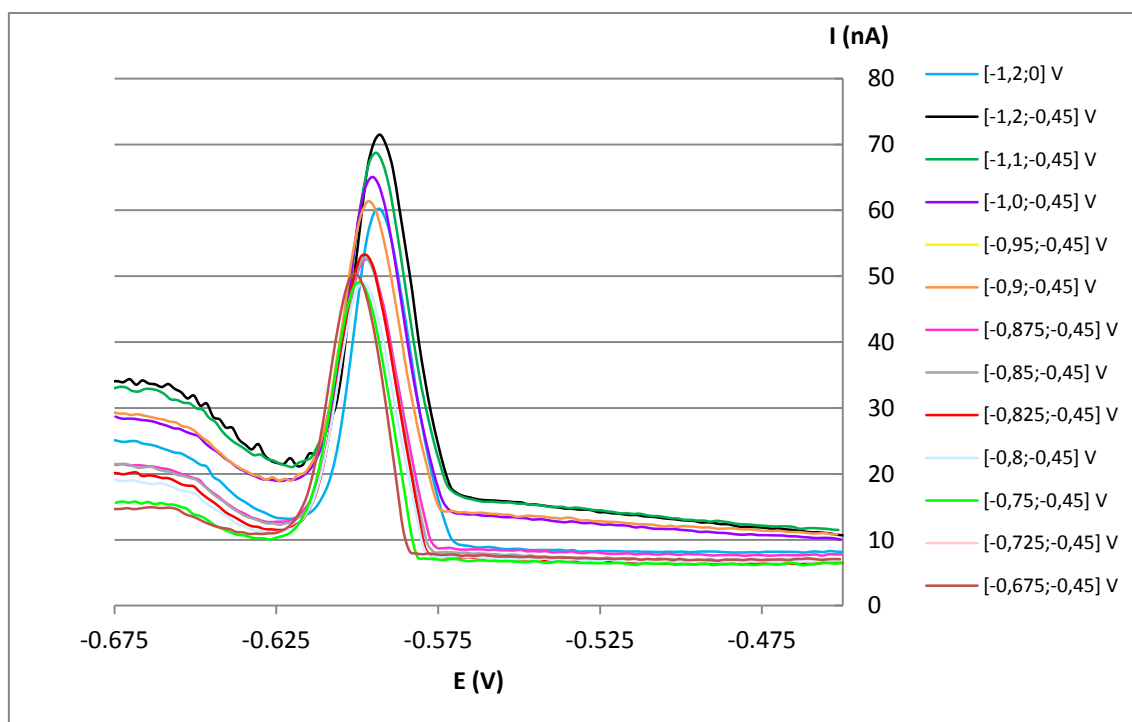
**Gráfico AII.1.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 8,83 μmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



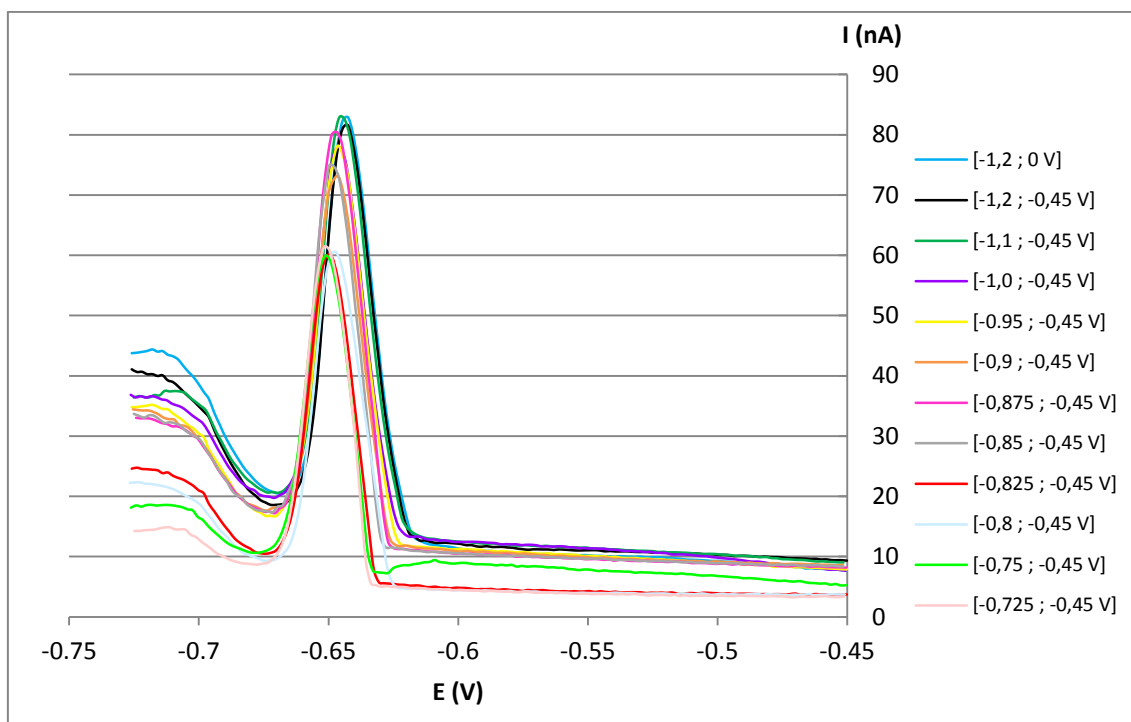
**Gráfico AII.2.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 8,83 μmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



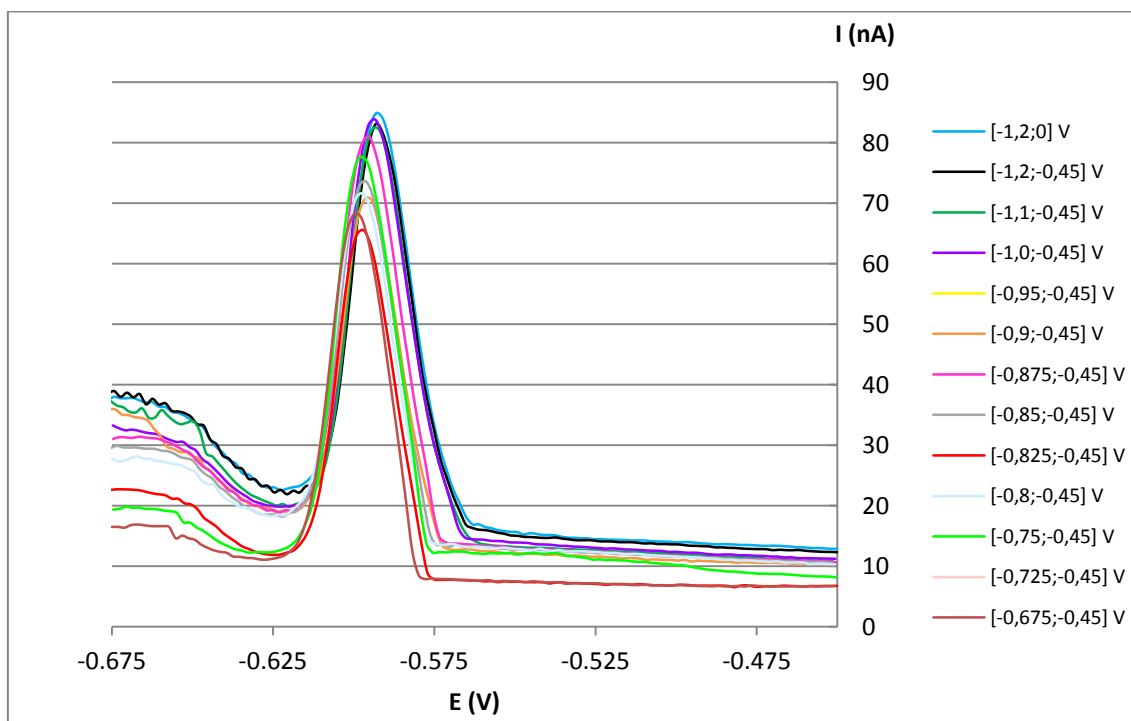
**Gráfico AII.3.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 17,61 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



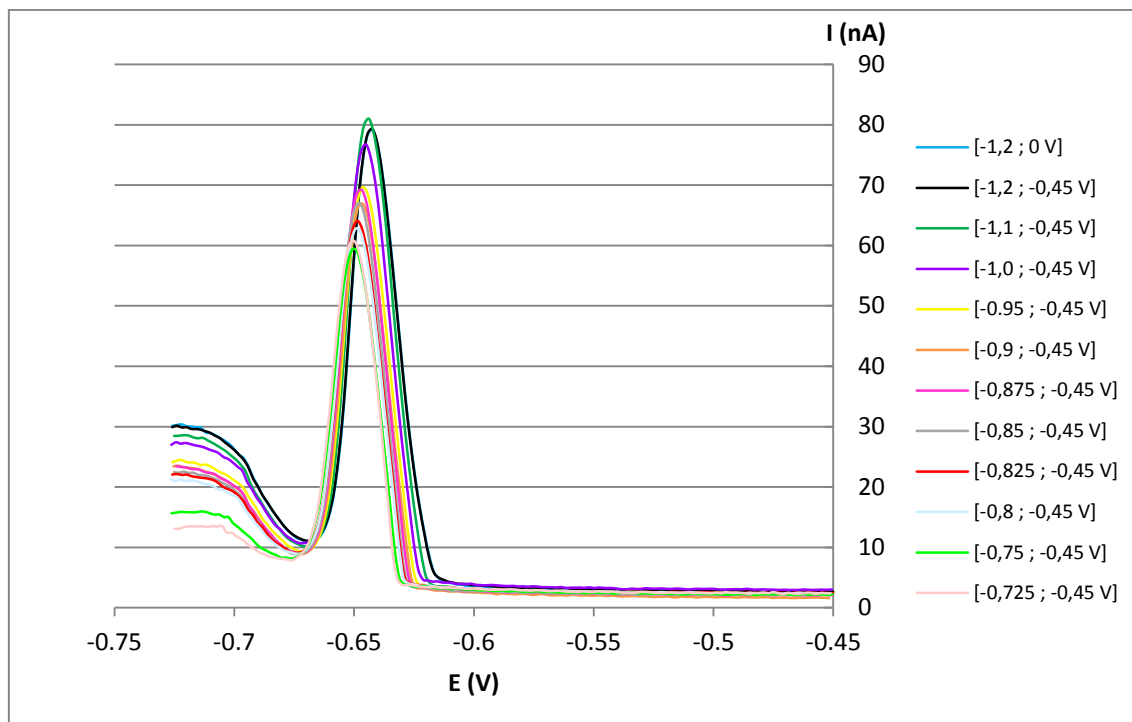
**Gráfico AII.4.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 17,61 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



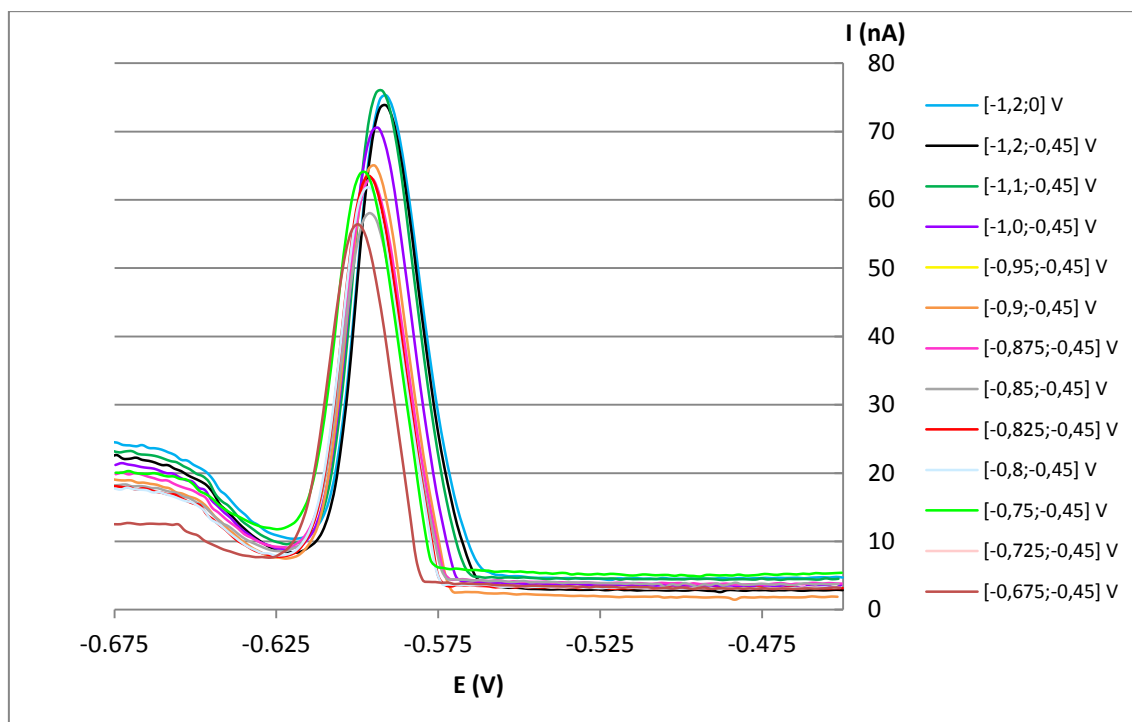
**Gráfico AII.5.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 26,35 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



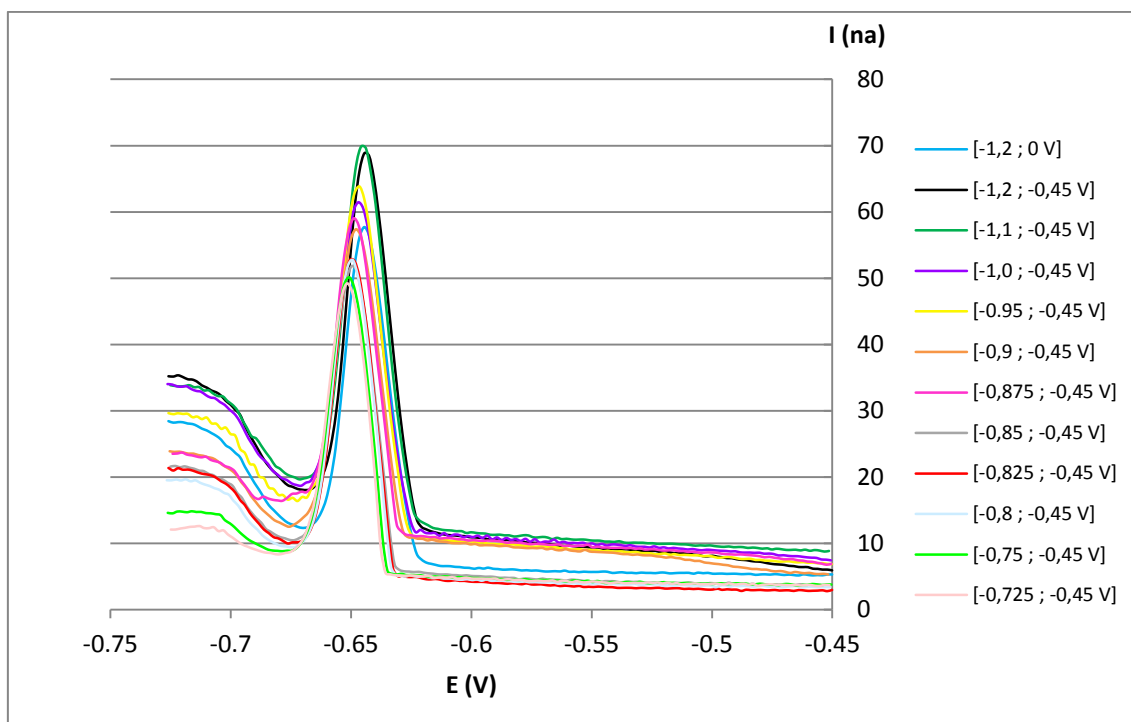
**Gráfico AII.6.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 26,35 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



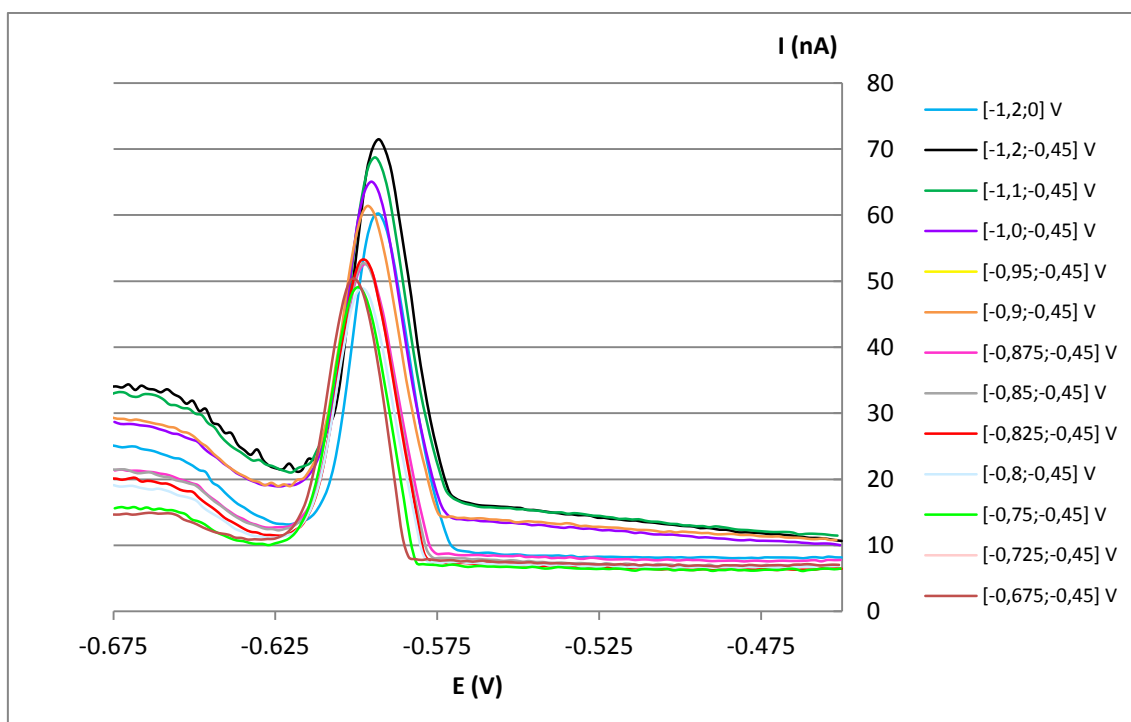
**Gráfico AII. 7.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 35,05 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



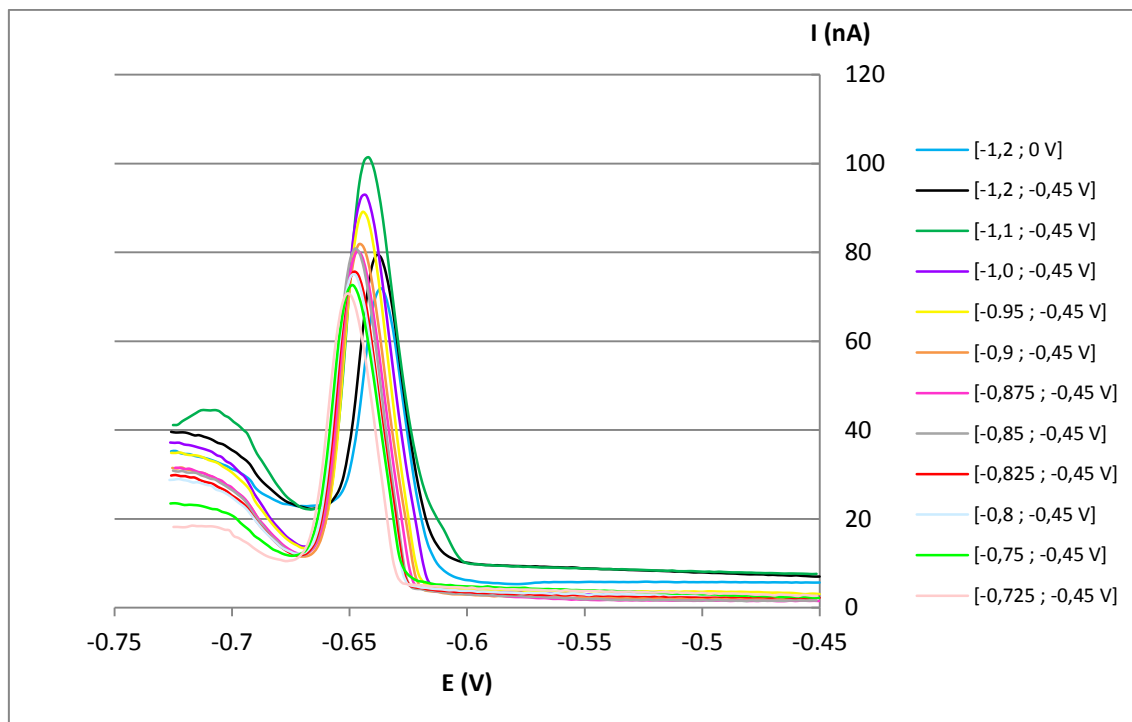
**Gráfico AII. 8.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 35,05 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



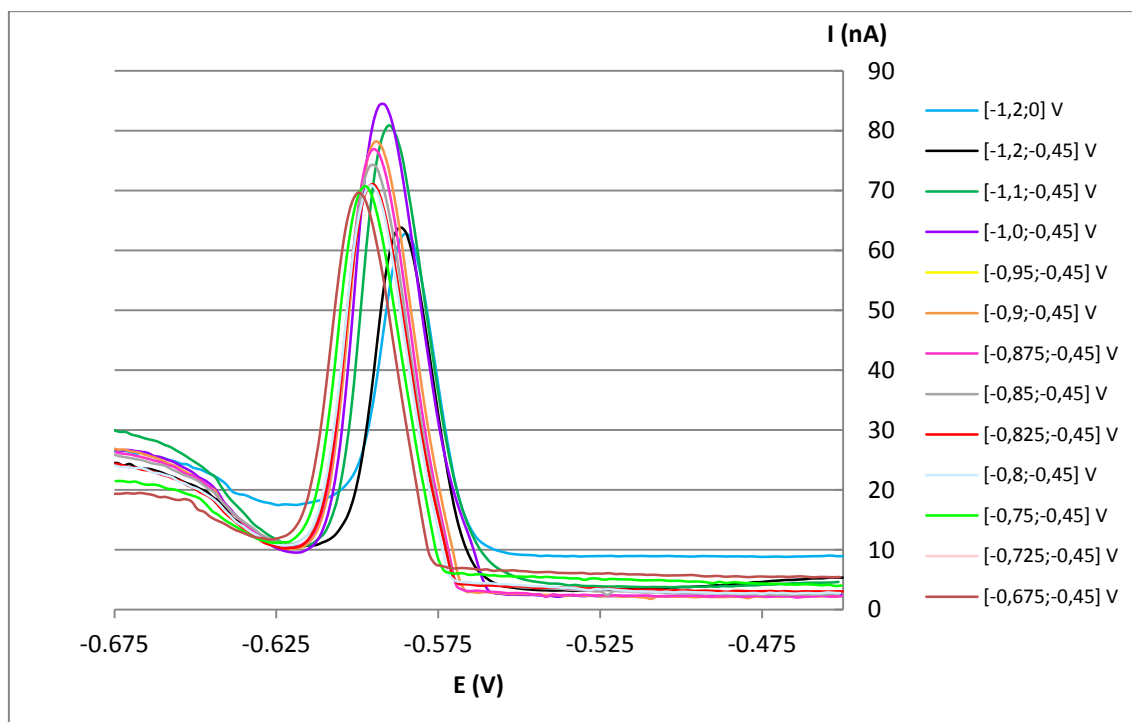
**Gráfico AII. 9.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 43,70 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



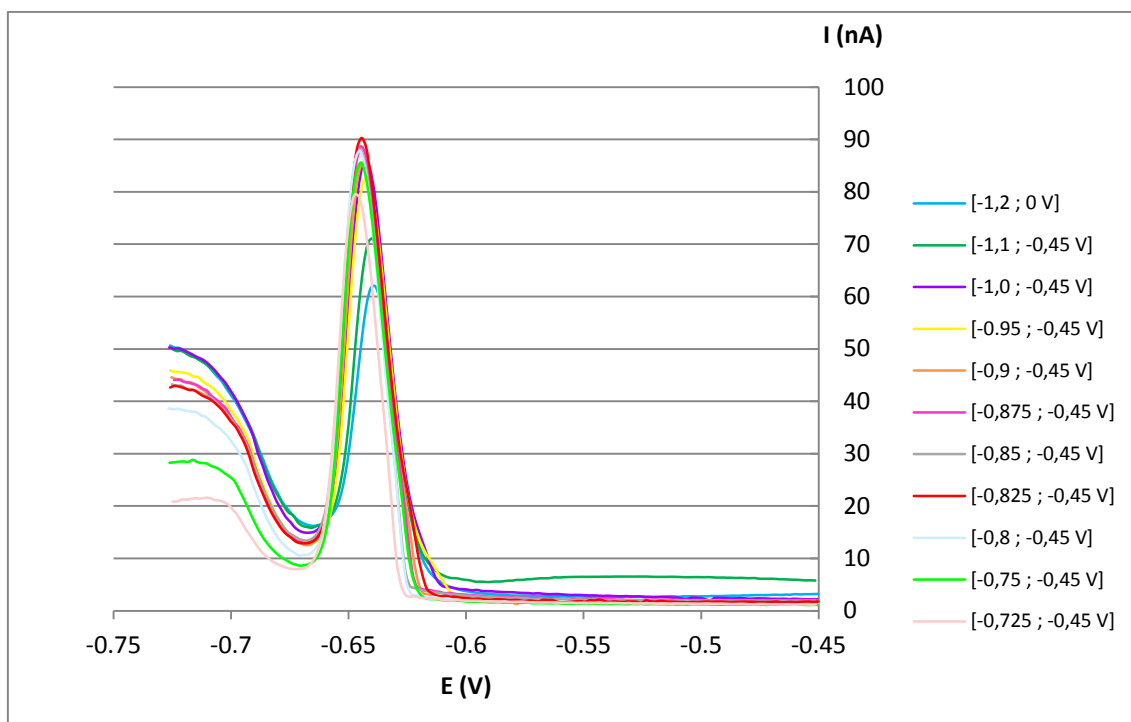
**Gráfico AII. 10.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 43,70 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



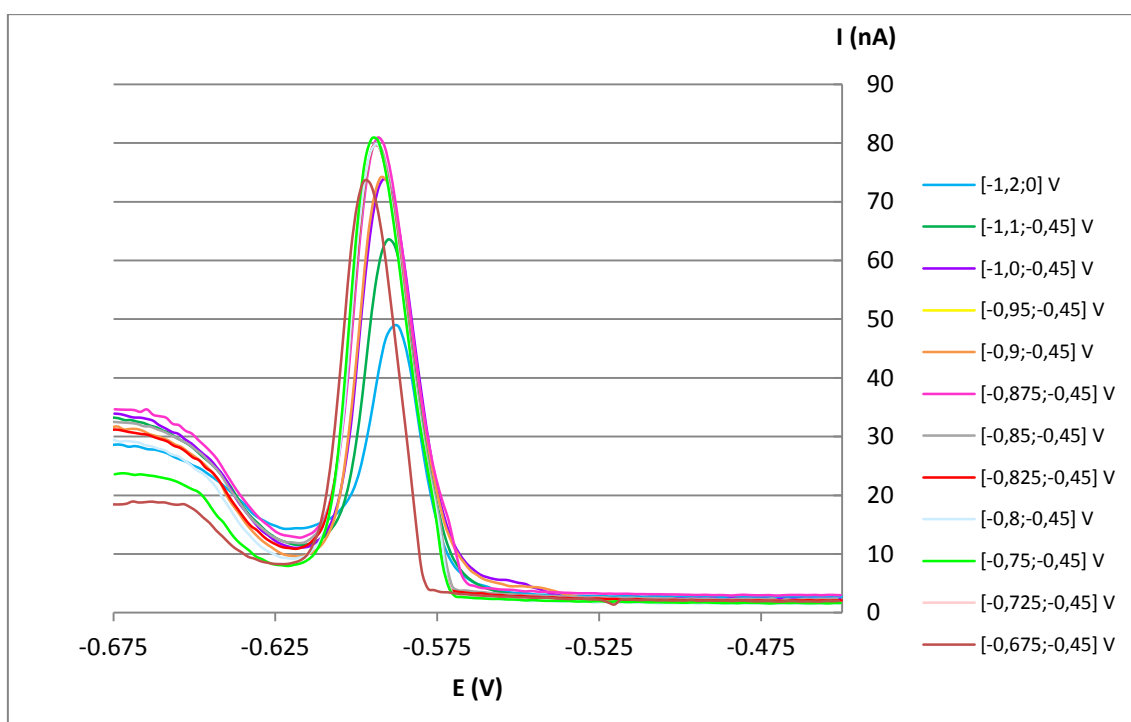
**Gráfico AII. 11.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 52,32 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



**Gráfico AII. 12.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 52,32 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.



**Gráfico AII. 13.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 60,88 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=100 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.

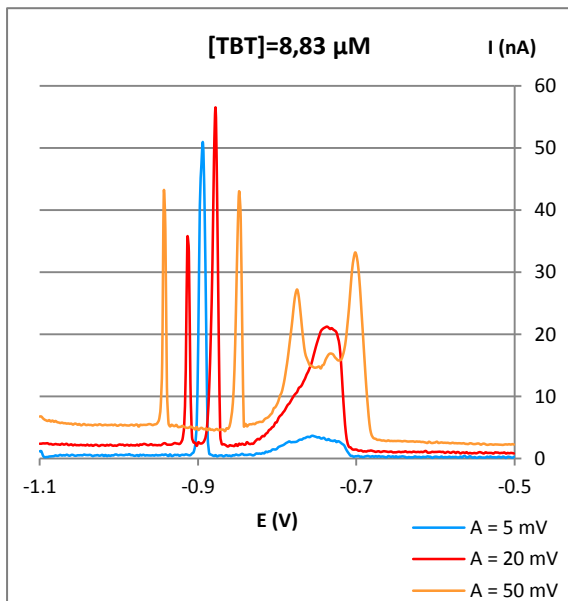


**Gráfico AII. 14.** – Voltamogramas fazendo variar o valor de potencial inicial e final de varrimento, aplicado a uma solução contendo 20 mL de electrólito de suporte (tampão fosfato 0,2 mol.dm<sup>-3</sup>) e TBT com concentração igual a 60,88 µmol.dm<sup>-3</sup>. Estes voltamogramas foram obtidos com A=150 mV, T<sub>eq</sub>= 5 s, f= 25 Hz e pH= 5,99.

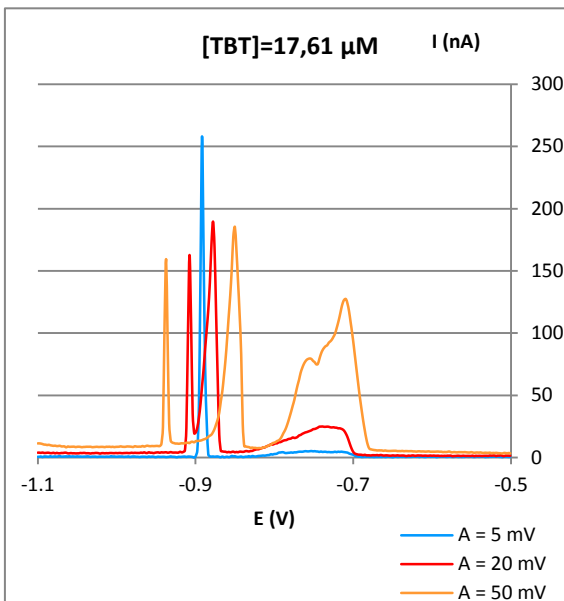




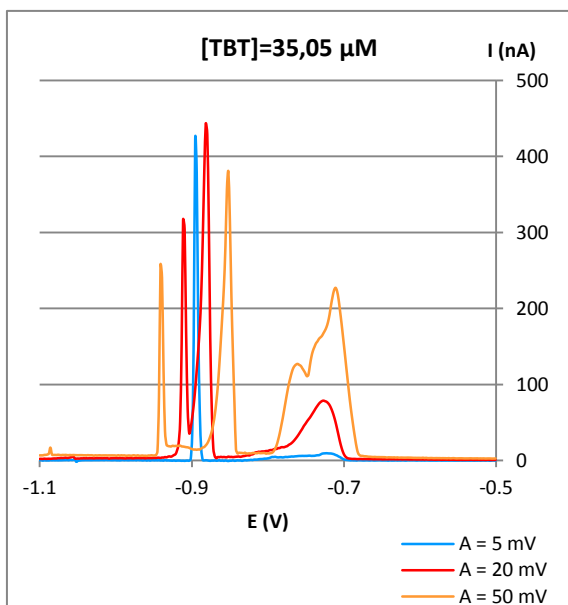
## Anexo III – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s



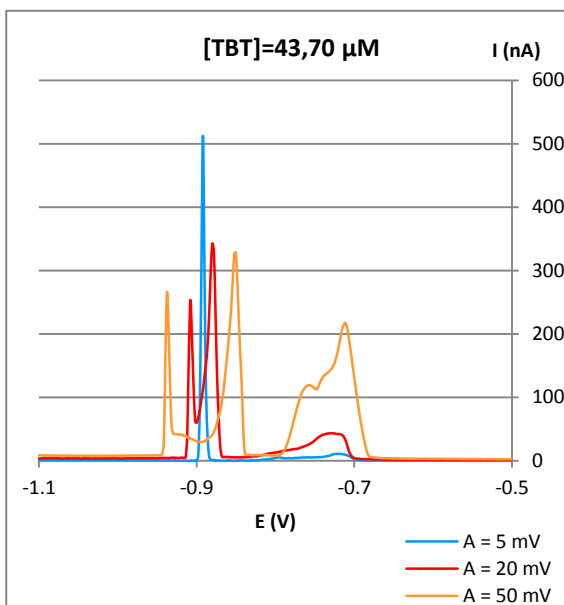
**Gráfico AIII.16.** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de 8,83  $\mu\text{M}$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.



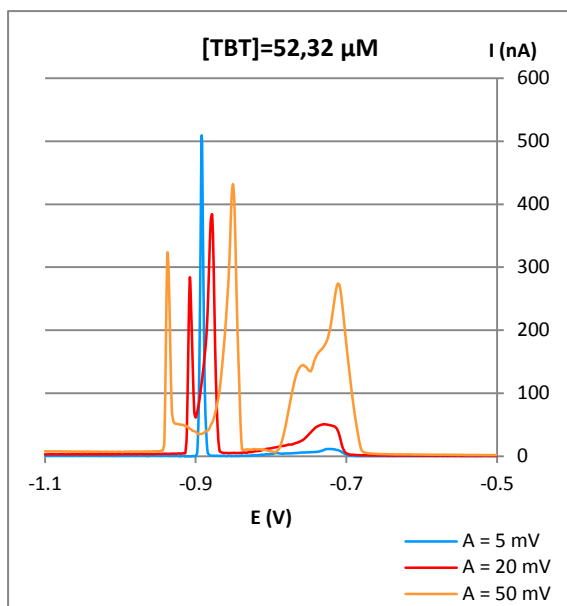
**Gráfico AIII.15.** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de 17,61  $\mu\text{M}$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.



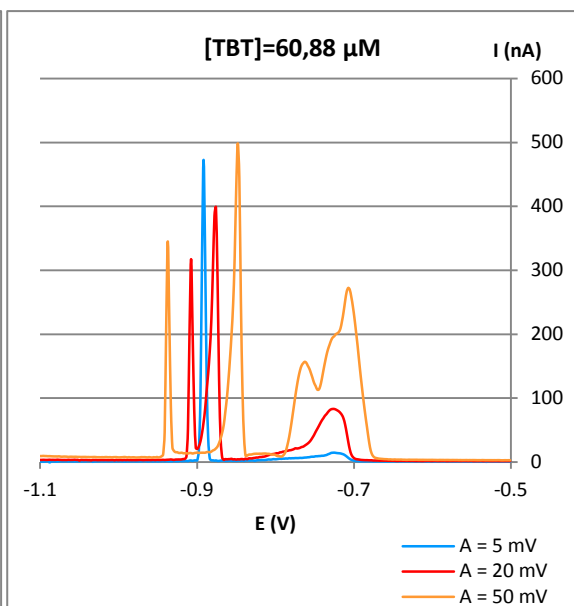
**Gráfico AIII.17.** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de 35,05  $\mu\text{M}$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.



**Gráfico AIII.18.** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de 43,70  $\mu\text{M}$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.



**Gráfico AIII.20.** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de  $52,32 \mu M$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.



**Gráfico AIII.19.** – Voltamogramas para um tempo de equilíbrio de 0 s, fazendo um varrimento de potencial entre -0,5V e -1,1V, com uma frequência fixa de 50Hz e a pH controlado pela adição de HCl, para um valor de 5,99. Utilizou-se uma concentração de TBT de  $60,88 \mu M$  e fez-se variar a amplitude, utilizando valores de 5mV, 20mV e 50mV.